

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1948-1949

Série Etat N° 32

**Contribution à l'étude
des substances antibiotiques
produites par les bactéries
du groupe du *Bacillus subtilis***

PREMIÈRE THÈSE

pour l'obtention du
Diplôme de Doctorat d'Etat en Pharmacie

Présentée et soutenue le *27 juin* 1949

PAR

Denise COURTILLET

Titulaire des Certificats d'Etudes supérieures de Chimie biologique appliquée
et de Microbiologie, Sérologie, Hématologie et Parasitologie

Jury : MM. A. SARTORY, Président,
G. VALETTE, Professeur,
M^{lle} S. LAMBIN, Maître de Conférences.

Imprimerie RICHARD
24, rue Stéphenson
Paris (18^e)

ERRATA

Page 25 :

Paragraphe b) *au lieu de* : 0.02 %, *lire* : 0.02 ‰

Paragraphe c) *au lieu de* : + 0.02 %, *lire* : + 0.02 ‰

Page 43, dernière ligne : *au lieu de* : 0.15 %, *lire* : 0.15 ‰

Page 49, avant dernière et dernière ligne interverties.

Page 84, 4^e ligne :

Au lieu de : genre, *lire* : germe.

Page 105, dans le 2^e tableau : *au lieu de* : 600 unités, *lire* : 1 heure avant.

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Nom du Candidat : **COURTILLET**

Prénoms : **Denise**

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre :

1

COURTILLET (Denise). —

Contribution à l'étude des substances antibiotiques produites par les bactéries du groupe du *Bacillus subtilis*. — *Paris, Ed. Richard, 1949, in-8°, 128 pages. (Th. pharm. (Etat), Paris, 1948-49, n° 32).*

2

COURTILLET (Denise). —

Contribution à l'étude des substances antibiotiques produites par les bactéries du groupe du *Bacillus subtilis*. — *Paris, Ed. Richard, 1949, in-8°, 128 pages. (Th. pharm. (Etat), Paris, 1948-49, n° 32).*

3

COURTILLET (Denise). —

Contribution à l'étude des substances antibiotiques produites par les bactéries du groupe du *Bacillus subtilis*. — *Paris, Ed. Richard, 1949, in-8°, 128 pages. (Th. pharm. (Etat), Paris, 1948-49, n° 32).*

4

COURTILLET (Denise). —

Contribution à l'étude des substances antibiotiques produites par les bactéries du groupe du *Bacillus subtilis*. — *Paris, Ed. Richard, 1949, in-8°, 128 pages. (Th. pharm. (Etat), Paris, 1948-49, n° 32).*

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

COURTILLET

Denise

Nom du Candidat :

Prénoms :

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre :

COURTILLET (Denise)

Contribution à l'étude des substances antitumorales produites par les bactéries du groupe du bacillus subtilis - Paris, Ed. Masson, 1948, n° 8, 128 pages (Th. pharm. (État), Paris, 1948-49, n° 32).

COURTILLET (Denise)

Contribution à l'étude des substances antitumorales produites par les bactéries du groupe du bacillus subtilis - Paris, Ed. Masson, 1948, n° 8, 128 pages (Th. pharm. (État), Paris, 1948-49, n° 32).

COURTILLET (Denise)

Contribution à l'étude des substances antitumorales produites par les bactéries du groupe du bacillus subtilis - Paris, Ed. Masson, 1948, n° 8, 128 pages (Th. pharm. (État), Paris, 1948-49, n° 32).

COURTILLET (Denise)

Contribution à l'étude des substances antitumorales produites par les bactéries du groupe du bacillus subtilis - Paris, Ed. Masson, 1948, n° 8, 128 pages (Th. pharm. (État), Paris, 1948-49, n° 32).

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1948-1949

Série Etat N° 32

**Contribution à l'étude
des substances antibiotiques
produites par les bactéries
du groupe du *Bacillus subtilis***

PREMIÈRE THÈSE

pour l'obtention du

Diplôme de Doctorat d'Etat en Pharmacie

Présentée et soutenue le

27 juin

1949

PAR

Denise COURTILLET

Titulaire des Certificats d'Etudes supérieures de Chimie biologique appliquée
et de Microbiologie, Sérologie, Hématologie et Parasitologie

Jury : MM. A. SARTORY, Président,
G. VALETTE, Professeur,
M^{lle} S. LAMBIN, Maître de Conférences.

Imprimerie RICHARD
24, rue Stéphenson
Paris (18^e)

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. René FABRE.....	Doyen, O. *, § I.
R. DELABY.....	Assesseur, O. *, § I.
G. CUVIER.....	Secrétaire, § I.
L. JEANDEL.....	Rédacteur, § A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, O. *, § I.....	Toxicologie.
DELABY O. *, § I....	Pharmacie chimique.
SARTORY, (A.) C. *, § I.	Microbiologie.
PICON, *, § I.....	Chimie minérale.
MASCRE, *, § I.....	Botanique.
FLEURY, *, § I.....	Chimie biologique.
JANOT, § I.....	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, § I.....	Chimie organique.
VALETTE, § I.....	Physiologie et Pharmacodynamie.
BEDEL, *, § I.....	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT	Physique.
GAUTIER, § I.....	Chimie analytique.
RAOUL	Professeur sans Chaire.
DOMANGE, § I.....	Professeur sans Chaire.
CRETE	Professeur sans Chaire.
COURTOIS	Professeur sans Chaire.

*Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, § I.*

Professeurs honoraires :

MM. DELEPINE, O. *, § I., LEBEAU, C. *, § I.,	Membres de l'Institut.
PERROT, C. *, § I., COUTIERE, O. *, § I.	
BOUGAULT, O. *, § I., LUTZ, *, § I.,	
GORIS, O. *, § I. HERISSEY, O. *, § I.,	
LAUNOY, O. *, § I. SOMMELET O. *, § I.	

MAITRES DE CONFERENCES

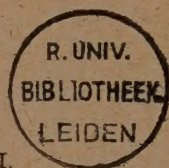
MM. MORETTE	Sciences physiques et chimiques.
CAVIER	Sciences naturelles.
LAMBIN (M ^{lle}), § I....	Sciences naturelles.
TRUHAUT *, § I.....	Sciences physiques et chimiques.
MOREAU	Sciences physiques et chimiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ § I	Physique.
HARISPE, trav. prat. de 1 ^{re} année....	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON	Botanique.
GERMAN	Microbiologie.
GIRARD	Chimie biologique.
MANGEOT	Chimie 4 ^e année.
N	Biologie animale.
N	Chimie analytique.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, § I.

Bibliothécaire : M^{lle} LAVAUD, § A.



A LA MEMOIRE DE MES CHERS DISPARUS

A MON PERE

A MA TANTE

A MON ONCLE

*Témoignage de ma très vive et très
profonde affection.*

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MONSIEUR LE DOYEN SARTORY
Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Commandeur de la Légion d'Honneur

qui m'a fait le grand honneur d'accepter de présider la soutenance de cette thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VALETTE
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

A MADEMOISELLE LAMBIN
Maître de Conférences
à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui m'ont accueillie avec bienveillance et ont accepté de juger cette thèse.

En témoignage de mon profond respect
et de ma très respectueuse reconnaissance

A MONSIEUR L. LUTZ
Professeur honoraire
à la Faculté de Pharmacie de Paris

*qui a bien voulu me témoigner sa
bienveillance et m'adresser ses
judicieux conseils sur la conduite
de cette étude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUL
Professeur à la Faculté Libre d'Angers
Directeur scientifique
de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc

*qui m'a permis d'effectuer ce tra-
vail aux Laboratoires de Recher-
ches de la Société des Usines chi-
miques Rhône-Poulenc.*

A MONSIEUR R. DESPOIS
Sous-Directeur des Recherches Pharmaceutiques
de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc

*qui m'a guidée de sa bienveillante
autorité dans la réalisation de cette
thèse.*

En témoignage de ma respectueuse gratitude
et de ma vive reconnaissance

INTRODUCTION

Au cours du travail que nous présentons, nous avons étudié les propriétés antibiotiques manifestées par certaines souches de *Bacillus subtilis*.

Depuis une cinquantaine d'années, diverses publications ont attiré l'attention sur le pouvoir antidotique, puis sur l'action bactériostatique et bactéricide exercée sur les germes les plus variés par de nombreuses espèces de ce groupe. Il était naturel au moment où la découverte de la Pénicilline mettait à l'ordre du jour la question des agents antibactériens élaborés par des microorganismes, que de nombreux chercheurs s'orientent vers cet ensemble de bacilles et ne se contentent plus seulement d'en montrer l'action antibiotique comme une simple curiosité, mais l'analysent plus profondément et tentent d'extraire les principes qui en sont la cause; leurs travaux ont déjà abouti à la caractérisation et à l'isolement de diverses Subtilines.

Sous le terme de « Subtilines », il faut entendre des substances élaborées par des germes du groupe *B. subtilis*, substances douées de certaines propriétés antibiotiques (bactériostatiques ou bactéricides) vis-à-vis d'autres microorganismes, pathogènes ou non, ou de propriétés antidotiques vis-à-vis de toxines bactériennes. D'une manière générale, on distingue les exosubtilines et les endosubtilines, suivant qu'elles sont sécrétées par le bacille dans son milieu de culture, ou qu'elles restent incluses dans les cellules microbiennes. Remarquons que cette distinction n'est pas absolument nette : en particulier, dans le cas de l'endosubtiline élaborée par la souche ATCC 6633, objet de la seconde partie de notre étude, nous avons pu constater qu'une fraction importante de l'activité peut, dans certaines conditions de culture, être retrouvée dans le bouillon nutritif. Nous avons toutefois gardé cette division pour la commodité de l'exposé du sujet, considérant comme exosubtiline un produit

actif caractérisé dans le milieu exocellulaire, et comme endosubtiline un antibiotique directement extrait des corps microbiens.

L'objet de la première partie de notre étude est l'examen de la production d'exosubtilines par diverses souches. Tout d'abord, nous avons observé l'élaboration, par un certain nombre de *B. subtilis*, de substances diffusant dans un milieu nutritif gélosé. Puis, choisissant les souches qui semblaient les plus intéressantes, nous avons étudié l'apparition d'exosubtilines dans les filtrats sur bougie Chamberland L³ de leurs cultures sur bouillon nutritif ; l'influence de la composition du milieu, ainsi que les conditions générales de culture, ont été examinées.

Dans une seconde partie, nous avons plus particulièrement étudié l'endosubtiline élaborée par la souche ATCC 6633. Cette endosubtiline est celle qui a été isolée de cette même souche par JANSEN et HIRSCHMANN, et qui à l'heure actuelle fait l'objet de l'étude de certains chercheurs américains du Western Regional Research Laboratory et du Northern Regional Research Laboratory. Ici, en prenant comme base les publications de ces auteurs, il nous a été possible d'obtenir une production d'antibiotique en quantité suffisamment importante pour nous permettre d'étudier les caractères du produit isolé. Le procédé de culture que nous avons utilisé pour obtenir le lot de Subtiline sur lequel nous avons travaillé est le procédé dit de « culture en surface » ; par la suite seulement, nous avons vérifié qu'un rendement satisfaisant était également obtenu en « culture immergée ».

Après l'étude de quelques propriétés de la Subtiline isolée, nous nous sommes attachée à celle de son activité antimicrobienne *in-vitro* (bactériostatique et bactéricide) et *in-vivo*. Nous avons effectué toute cette dernière partie en examinant parallèlement de la Pénicilline ; il était en effet intéressant de comparer les activités respectives de ces deux produits, dont les propriétés antimicrobiennes présentent une certaine similitude, s'adressant en particulier l'une et l'autre au staphylocoque, au pneumocoque et au streptocoque.

★ ★

Avant d'exposer les résultats de cette étude, je veux exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidée et dirigée au cours de mon travail.

Ma pensée se tourne tout d'abord vers mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Paris, auxquels je dois ma première formation scientifique.

Qu'il me soit permis d'évoquer la mémoire de Monsieur le Professeur RÉGNIER et de Monsieur le Professeur DAVID, auxquels je dois l'acquisition de mes premières connaissances bactériologiques et dont je suis heureuse d'avoir bénéficié de l'enseignement au cours du Certificat d'Etudes Supérieures de Bactériologie.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur VALETTE et Mademoiselle LAMBIN, Maître de Conférences, mes anciens professeurs, qui aujourd'hui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le professeur LUTZ de la haute bienveillance qu'il a bien voulu me témoigner, et des conseils éclairés dont je lui suis redevable.

Toute ma gratitude va également à Monsieur le Doyen SARTORY, Professeur de Microbiologie, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à la Direction de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc, qui m'a permis d'effectuer ce travail aux Laboratoires de Recherches de Vitry-sur-Seine. Je remercie en particulier Monsieur le Professeur R. PAUL, Directeur scientifique, Monsieur KOETSCHET, Sous-Directeur scientifique, qui m'ont dirigée dans ces recherches, Monsieur P. VIAUD, Directeur des Recherches Pharmaceutiques, qui m'a toujours témoigné sa bienveillance et m'a permis d'effectuer cette étude. Je suis heureuse aussi d'exprimer mes vifs remerciements à Monsieur R. DESPOIS, Sous-Directeur des Recherches Pharmaceutiques, qui a bien voulu me faire profiter de son expérience et me diriger utilement dans la conduite de ce travail, ainsi qu'à Monsieur le Docteur C. COSAR, pour les précieux conseils qu'il m'a toujours prodigués sans réserve; j'ai grandement apprécié toute la bienveillance qu'ils n'ont cessé de me témoigner au cours des années de travail que je viens de passer sous leur direction; qu'ils me permettent de les assurer de ma très profonde et très respectueuse sympathie.

Je remercie enfin tous mes camarades de laboratoire, avec lesquels j'ai toujours travaillé dans la meilleure entente et dont j'ai pu apprécier la complaisance, en particulier Madame PINNERT-SINDICO, Messieurs L. NINET, M. DUBOST et P. DEVOIZE. Je suis heureuse d'avoir l'occasion de les assurer de ma très grande et très amicale sympathie.

HISTORIQUE

Introduction - Antagonisme microbien

C'est dans les tout premiers débuts de la Bactériologie que nous trouvons l'origine des nombreuses études effectuées depuis sur l'antagonisme microbien. Le premier, PASTEUR signalait la difficulté présentée par un organisme à se développer sur un bouillon de culture contenant tous les éléments propres à assurer sa nutrition, mais où avait déjà végété un autre germe. Après avoir constaté la croissance pénible du Bacille charbonneux dans un bouillon de culture du microbe du choléra des poules, il tenta peu après de trouver une application *in-vivo* à ce phénomène : en 1880, réussissant le premier essai de bactériothérapie, il parvenait à conférer l'immunité charbonneuse à des poules en les vaccinant contre le choléra (93). Et il concluait : « si ce résultat se confirme, et principalement s'il se généralise pour d'autres maladies virulentes, on pourra en espérer les conséquences thérapeutiques les plus importantes, en ce qui concerne même la pathologie des maladies virulentes propres à l'espèce humaine ».

Peu après, EMMERICH (31), PAWLOWSKY (94), WATSON-CHEYNE (129), BOUCHARD (12), CHARRIN et GUIGNARD (13), BLAGOVESTCHENSKY (9), entre autres, tentèrent une application plus générale de cette notion d'antagonisme, cherchant surtout à provoquer une vaccination contre les microbes pathogènes à l'aide de bactéries inoffensives, et examinant aussi le résultat obtenu, sur un organisme infecté, par l'injection de certaines cultures microbiennes, soit vivantes, soit stérilisées.

Un autre point de vue conduisit les recherches de GARRE, de Bâle (44), puis de FREUDENREICH (43), qui s'intéressèrent à l'immunité conférée à un milieu de culture par le développement préalable de certains germes. Au cours d'une très belle étude, FREUDENREICH suivit le développement de 21 espèces sur des milieux où avaient

végété 13 autres, et, après avoir constaté l'action antagoniste remarquablement étendue de *B.pyocyaneus* et *B.phosphorescens*, nota une sélectivité d'action vis-à-vis des espèces sensibles.

Dans un autre ordre d'idées, METCHNIKOFF (81) attira peu après l'attention sur les propriétés antidotiques de certaines bactéries du groupe *B.subtilis*; cette question fut reprise et confirmée dix ans plus tard par M. NICOLLE (85) qui, en outre, étudia d'une manière très détaillée l'action antibiotique commune à de nombreux germes du même groupe.

Au cours de l'histoire des antibiotiques d'origine microbienne, nous relevons par la suite les noms de FORTINEAU, de Nantes (38), qui réalisa, d'ailleurs avec succès, la première application bactériothérapique humaine en traitant un cas de charbon par la pyocyanease. Plus près de nous se détachent en particulier les noms de VAUDREMER (127), qui en 1913 examina l'action des filtrats de culture d'*Aspergillus fumigatus* sur le bacille tuberculeux, de ROSENTHAL (103 à 108) qui, avec ses collaborateurs, s'intéressa aux lysobactéries, de GRATIA et DATH (48-49) qui signalèrent dès 1924 les propriétés antibiotiques d'un *Penicillium glaucum*, de FLEMING (37) enfin qui, en 1929, constata l'activité antibactérienne du *Penicillium notatum* et l'utilisa pour l'isolement du *B.influenzae*.

Nous voyons la longue évolution de l'histoire des antibiotiques, qui aboutit à son plein épanouissement avec la pénicillinothérapie et connaît à l'heure actuelle une ère de succès avec les résultats obtenus par ailleurs grâce à la Streptomycine et à la Tyrothricine. A côté de tous ces antibiotiques déjà consacrés, d'autres nous permettent les plus grands espoirs. Parmi ceux-ci se détachent en premier plan les substances actives élaborées par de nombreuses espèces du groupe *B.subtilis*; plusieurs ont déjà été isolées et présentent un intérêt considérable par les applications thérapeutiques qu'elles laissent envisager.

Substances antibiotiques produites par les bacilles du groupe *B. subtilis*

Bacillus subtilis fait partie du groupe des bacilles aérobies sporulés, remarqué depuis longtemps par de nombreux chercheurs qui se sont intéressés au problème de l'antagonisme microbien.

Parmi les représentants de ce groupe de bacilles, se trouvent des producteurs de substances antibiotiques s'attaquant aux organismes les plus divers : le bacille tuberculeux, des cocci à Gram +,

un certain nombre de bactéries à Gram —, dont celles du groupe typhique, voisinent avec certains champignons dans le vaste ensemble des germes sensibles cités. N'oublions pas, dans un autre ordre d'idées, les propriétés antidotiques remarquées sur les bouillons de culture de plusieurs souches.

Les propriétés antidotiques des bacilles du groupe *Subtilis-Mesentericus* furent tout d'abord signalées en 1897 par METCHNIKOFF (81). Celui-ci pu constater en effet un abaissement notable du pouvoir toxique de la toxine d'un bouillon tétanique où avaient végété des bacilles de ce groupe. M. NICOLLE (85) enregistra, dix ans plus tard, un fait semblable pour une autre souche de *B.subtilis* qu'il trouva active sur les toxines diphtérique et tétanique, et les toxines de certains anaérobies tels que le Vibrion septique. Les mêmes propriétés ont à nouveau été observées par RAMON et RICHOU (97 à 101) sur des filtrats de culture de *B.subtilis*.

Les propriétés antibiotiques proprement dites furent constatées en 1907 par M. NICOLLE (85). Examinant une souche particulière isolée de l'air à Constantinople, ce dernier obtint des filtrats actifs après 3 jours de culture à 37° sur bouillon peptoné à 2 %; des résultats analogues, quoique moins marqués, furent également obtenus à partir d'organismes voisins, des genres *Tyrothrix*, *Mesentericus*, et d'un autre *B.subtilis*. NICOLLE étudia les activités bactériolytique, bactériostatique et bactéricide de sa souche particulière. En outre, il attira l'attention non seulement sur l'action bactériolysante du *B.subtilis*, capable de se développer sur des suspensions microbiennes en les éclaircissant, mais aussi sur le pouvoir lytique des filtrats de culture. Les germes sensibles à la souche de NICOLLE se révélèrent nombreux : *Pneumocoque*, *B. de la morve*, *B. typhique*, *B. coli*, *Bactéridie charbonneuse*, *B. de Shiga*, *Vibrion cholérique*, *B. pesteurs*, etc...

Des études analogues furent conduites par WOLFF (132), BESTA et KUHN (7), par ROSENTHAL et ses collaborateurs (103 à 108) qui, à côté de nombreuses lysobactéries de la flore bactérienne thermophile, examinèrent en particulier *Tyrothrix scaber*. MUCH et SARTORIUS (83-84) mirent en lumière l'action antagoniste exercée principalement sur des bactéries à Gram — par une souche de *B.mycoides*. tandis que PRINGSHEIM (96) montra l'action antibiotique d'une souche de *B.mesentericus* sur *Corynebacterium diphteriae*, question reprise plus récemment par WEILAND (130) et aussi par HETTICHE et WEBER (52).

Le bacille tuberculeux est également sensible à l'action de diverses souches de *B.subtilis*. Ce fait, d'abord constaté par KIMMELSTIEL pour

un *B. mycoïdes* (63-64), fut aussi mis en évidence par VAN CANNEYT sur un *B. subtilis* (126). Il a été signalé récemment pour des substances isolées : *Endosubtilysine* de OLIVIER, *Bacilline* de FOSTER, *Subtiline* de JANSEN.

L'action antagoniste du groupe *B. subtilis* ne s'adresse pas uniquement à des bactéries; elle s'exerce également sur un certain nombre de champignons pathogènes et saprophytes, ainsi qu'en témoignent les travaux de CORDON et HAENSELER (18), CHRISTENSEN et DAVIES (17), BITTER (8), et HUMFELD et FEUSTEL (58). Récemment, MICHENER et SNELL (82) ont également signalé l'action antifongique de certaines cultures du *B. subtilis* ATCC 6633.

D'autre part, le virus rabique serait lui aussi sensible à l'action antibiotique d'un certain nombre de souches de *B. subtilis* (102).

Signalons encore l'action antagoniste du groupe *B. subtilis* vis-à-vis de certains Protozoaires de la série animale : l'activité bactéricide exercée *in-vitro* par les filtrats de certaines cultures sur *Trypanosoma Togolense*, *Spirochaeta duttoni* et *Leishmania* a été mise en évidence dès 1911 par LEVADITI et TWORT (67 à 73). Récemment, ANDERSON et ses collaborateurs (3) d'une part, LEVADITI et HENRY (66) d'autre part, ont étudié l'action trypanocide de la *Subtiline* de JANSEN : très marquée *in-vitro*, cette action n'a malheureusement pas été confirmée *in-vivo*.

A la suite des observations générales, un certain nombre de travaux ont été effectués, ayant pour but l'isolement des substances responsables de l'activité des cultures. Parmi celles-ci, les plus notables sont : la *Tyrothricine*, produite par *B. brevis*, et qui a fait l'objet de l'étude de HOOGERHEIDE (54), HOTCHKISS (55), DUBOS (24 à 26), DUBOS et HOTCHKISS (27) — la *Gramicidine S* de BELOZERSKY et PASKHINA (5) — le composé élaboré par une souche de *B. mycoïdes* qu'étudia KIMMELSTIEL (64) — la *Simplexine* de KATZNELSON (62) et CORDON et HAENSELER (18).

De diverses souches du genre *B. subtilis* ont été retirées : la *Subtiline* de JANSEN et HIRSCHMAN (59); la *Bacilline* de FOSTER et WOODRUFF (41), fraction filtrable active sur *E. coli*; la *Bacitracine* de JOHNSON (60), exosubtiline active principalement sur les bactéries à Gram + ; la *Subtilysine* de VALLEE (124-125), antagoniste principalement des bactéries à Gram — ; la *Subtiline* de RAMON et RICHOU (97 à 101), produite par une souche dont les bouillons de culture possèdent des propriétés antidotiques et s'opposent en outre au développement du *B. diphtérique* et des Bacilles pseudotuberculeux; l'*Endosubtilysine* de OLIVIER (86 à 91), produit extrait des corps microbiens. Notons aussi l'*Eumycine* de JOHNSON et BURDON (61),

Produits actifs	Auteurs	Nature	Stabilité	Activité in vitro	Activité in vivo	Action des substances org. complexes	Applications thérapeutiques
Subtiline	Jansen et Hirschman (59)	Endosubtiline	Stable en m. acide Instable en m. alcalin	Cocci Gram + Gonocoque-Méningocoque Myc. tuberculosis	Pneumocoque Streptocoque (souris) B. anthracis (cobaye)	Détruit par pepsine trypsine	
Bacitracine	Johnson, Anker et Meleney (60)	Exosubtiline	Stable en m. acide Instable en m. alcalin	Cocci Gram + Gonocoque-Méningocoque	Streptocoque hémolytique (souris) (Clostridium septicum (cobaye)	Non détruit par ferments protéolytiques.	Locales (Streptocoque hémolytique staphylocoque)
Subtilysine	Vallée (124-125)	Exosubtiline	Stable à la température ordinaire Détruite en 1 1/2 h. à 80°	E. Coli Brucella abortus, Pasteurellae Vibron septique			
Endosubtilysine	Olivier (86 à 91)	Endosubtiline		Groupe typique Staphylocoque-Streptocoque Myc. tuberculosis			
Subtiline	Ramon et Richou (97 à 101)	Exosubtiline (filtrat de culture)	Stable à 55° Non altérée par le formol	Coryn. diphteriae Bac. pseudo-tuberculeux Bactérie charbonneuse Toxines microbiennes			
Bacilline	Foster et Woodruff (41)	Exosubtiline	Stable en m. acide	Groupe typique Streptocoque hémolytique Pneumocoque	Inactive	Perte d'activité en présence de subst. organiques complexes	
Eumycine	Johnson et Burdon (61)	Exosubtiline	Stable en m. acide Instable en m. alcalin	Staphylocoque Myc. tuberculosis Coryn. Diphteriae Champignons pathogènes			
Colistatine	Gause (47)	Exosubtiline (Produite dans milieux glucosés)		Groupe typique Pneumocoque Staphylocoque	Borrelia sogdianum (souris)		
Subténoline	Hirschhorn, Bucca, Thayer (53 et 57)	Exosubtiline	Stable à la chaleur	Groupe typique Staphylocoque Myc. tuberculosis		Perte d'activité en présence de subst. organiques complexes	
Bacillomycine	Landy, Warren, Roseman, Colio (65)	Exosubtiline	Stable en milieux acides et alcalins	Antifongique		Non détruit par ferments protéolytiques	

et la *Subténoline* qui vient d'être étudiée par HIRSCHHORN, BUCCA et THAYER (53), ainsi que par HOWELL et TAUBER (57). De plus, une *Colistatine* a été présentée par GAUSE (47). En outre vient d'être extrait un produit antifongique, actif principalement sur les champignons pathogènes dermatophytes : la *Bacillomycine* (65).

Tous ces antibiotiques se différencient les uns des autres par des caractères spécifiques. La *Subtiline* de JANSEN, extraite des corps microbiens, est surtout active sur des bactéries à Gram + ; la *Bacitracine* présente un spectre antibactérien très voisin, mais provient des jus de culture. La *Bacilline* correspond à une fraction filtrable active sur le groupe typhique, ainsi que sur le Streptocoque hémolytique et sur le Pneumocoque; en présence de substances organiques complexes, elle montre une perte d'activité certaine. L'*Eumycine* est d'un moindre intérêt, car elle n'est active qu'à un faible degré sur le Staphylocoque et germes à Gram +, et pas du tout sur les bacilles du groupe typhique. La *Subtilysine* de VALLEE inhibe le développement de *Escherichia coli* et des *Clostridia*, mais non celui du Staphylocoque. L'*Endosubtilysine* de OLIVIER est antagoniste des bacilles du groupe typhique, du Staphylocoque, du Streptocoque et du bacille tuberculeux. La *Subténoline* enfin, produit extrait des filtrats de culture, actif sur diverses bactéries à Gram + et à Gram —, présente l'inconvénient, ainsi que la *Bacilline*, d'être fortement inactivée en présence de substances organiques. La *Colistatine* n'est produite que dans des milieux glucosés et, en dehors du groupe typhique, inhiberait le Pneumocoque.

Dans notre étude, après avoir effectué quelques essais tendant à mettre en évidence la production de substances actives diffusibles dans la gélose à partir de diverses souches de *B. subtilis*, nous avons retenu la souche ATCC 6633 (souche de JANSEN), et la souche de *B. subtilis* *Foster-Woodruff* (souche Pénicillino-sensible de FOSTER et WOODRUFF (39-40). Nous avons pu mettre en évidence la production par ces deux dernières, au début de certaines cultures sur milieu glucosé, d'exosubtiline active sur Staphylocoque, filtrable à travers bougie L3 et diffusant dans la gélose. Puis nous avons cherché à obtenir une production d'endosubtiline comparable à la *Subtiline* de JANSEN à partir de la souche ATCC 6633 et avons examiné la nature et les propriétés de cette endosubtiline.

DEFINITION DU BACILLUS SUBTILIS

Très longtemps le groupe du *Bacillus subtilis* est resté peu connu; il comprenait tout un ensemble de bacilles décrits par de nombreux auteurs et présentant des caractères morphologiques plus ou moins voisins de ceux du « bacille du foin » isolé et décrit par COHN.

Plusieurs auteurs se sont attachés à la question au cours de ces dernières années, et sont arrivés à classer d'une manière définie ces bacilles que l'on faisait indistinctement entrer auparavant dans le « groupe Subtilis ». L'ensemble des résultats est exposé dans le *Manual of Determinative Bacteriology*, de BERGEY (6^e édition) (6).

D'après la classification de BERGEY, le groupe du *Bacillus subtilis* est un des représentants du genre *Bacillus*; celui-ci, un des deux éléments composant la famille des *Bacillaceae*, comprend des bactéries aérobies, tandis que les anaérobies de cette même famille constituent le genre *Clostridium*.

Le groupe *B. subtilis* est constitué par un ensemble de germes en bâtonnets, mesurant 0,7 à 0,8/2 à 3 μ , aérobies facultatifs, capables de former des endospores, mésophiles (ils montrent une croissance optima pour des températures s'étageant de 20°C à 37°C). Ils sont mobiles et en général prennent la coloration de Gram, réduisent les nitrates en nitrites, et produisent de l'acétyl-méthyl-carbinol; leurs spores sont ovales ou cylindriques, centrales ou terminales, non déformantes.

B. subtilis et *B. mesentericus*, ainsi que leurs très proches voisins dans la classification : *B. simplex*, *B. mycoides* et *B. brevis*, constituent ce groupe de bacilles aérobies sporulants qui comporte de très nombreuses variétés susceptibles de produire des substances antibiotiques, signalées à maintes reprises dans la littérature.

C'est à l'étude de certaines variétés de *B.subtilis* que nous nous sommes attachée dans ce travail. Les souches que nous avons examinées sont les suivantes :

— *B.subtilis* Pasteur, *B.subtilis* Ungar, *B.subtilis* B2 Ciné, *B.subtilis* champignon, *B.subtilis* Caron, *B.subtilis* B 90, *B.subtilis* table SNCF, qui, sous ces dénominations, nous ont été obligeamment remises par M. Boyer, de l'Institut Pasteur.

— *B.subtilis* MD 1 et MD 2, de la Collection du Laboratoire de Bactériologie de la Société Rhône-Poulenc.

— *B.subtilis* DO, DA et DE, que nous devons à l'amabilité de M. Duché.

— la souche de *B.subtilis* utilisée par FOSTER et WOODRUFF dans leurs procédés de dosage de la Pénicilline (39-40) : nous désignons cette souche sous le terme *B.subtilis* Foster-Woodruff dans la suite de cet exposé.

— *B.subtilis* ATCC 6633, dont JANSEN et HIRSCHMAN mirent en évidence la production de Subtiline, étude poursuivie à l'heure actuelle aux U.S.A. par le Western Regional Research Laboratory et le Northern Regional Research Laboratory. Cette souche est le *B.subtilis* n° 231 du N R Smith of the U.S. Department of Agriculture, Bureau of Plant, Industry, Soils, and Agricultural Engineering; déposée à l'American Type Culture Collection sous le n° 6633, elle est également entretenue dans la collection du Northern Regional Research Laboratory sous le n° B-543 et dans celle du Lister Institute.

PREMIERE PARTIE

EXOSUBTILINES

I

ETUDES PRELIMINAIRES : MISE EN EVIDENCE D'EXOSUBTILINES PAR LA METHODE DES ENSEMENCEMENTS EN STRIES PERPENDICULAIRES

Au début de notre étude, il nous a été possible de mettre en évidence la production, par plusieurs souches de *B. subtilis*, d'une substance antimicrobienne diffusible dans la gélose, au moyen du procédé général des ensemencements en stries perpendiculaires utilisé par FOSTER et WOODRUFF (41), et aussi, dans un autre but, par FREDERICQ et GRATIA (42).

Principe de cette méthode. — Les germes dont on veut essayer la sensibilité sont ensemencés sur un milieu nutritif gélosé suivant des traits disposés perpendiculairement à une première culture de l'organisme producteur d'antibiotique. Au cours de la première culture, la substance active sécrétée a diffusé dans la gélose, réalisant une zone antibiotique où ne peuvent se développer les germes sensibles. Après une deuxième incubation à 37°C, la mesure de la longueur de cette zone d'inhibition traduit la diffusion dans la gélose de cette substance (exosubtiline) qui empêche le développement du second microbe réensemencé.

Nous avons d'abord constaté le phénomène pour un certain nombre de souches de *B. subtilis*, et mis en évidence les variations

présentées par les spectres antibactériens des exosubtilines de diverses souches. Puis, dans un second temps, ayant choisi la souche qui donnait une zone d'inhibition sur *Staphylocoque* nettement supérieure à celles qui étaient déterminées par les souches voisines, nous avons essayé d'utiliser ce même procédé pour choisir une formule de milieu nous conduisant à des zones d'inhibition de diamètres intéressants.

Cette méthode est sujette évidemment à de nombreuses critiques. En particulier, comme elle n'est qu'une traduction de la diffusion dans la gélose des produits actifs, la comparaison des subtilines élaborées par diverses souches ne saurait être rigoureuse : ces substances antibiotiques ne sont en effet pas toutes identiques, et la nature des molécules intervient dans le degré de diffusion. En outre, pour une même subtiline, les résultats des essais de comparaison de milieux de culture sont fortement influencés par le fait que la composition du milieu influe d'une part sur la croissance du germe sensible, et d'autre part sur le degré d'inhibition de ce germe par la substance active.

Nous avons toutefois utilisé en premier lieu cette méthode de travail, en la considérant comme un « procédé d'orientation » de nos essais ultérieurs.

Technique. — Tout d'abord, on effectue avec une anse de platine un ensemencement en trait de la souche active, sur la partie médiane de boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, contenant 20 cm³ de milieu nutritif gélosé. Une première incubation assure le développement de la souche considérée, et éventuellement permet la production de substance antibiotique diffusible. Au bout d'un certain temps (nous avons choisi uniformément 48 heures), on ensemence, suivant des raies perpendiculaires à la première culture, les germes sensibles dont on veut étudier le comportement : ces derniers ensemencements sont réalisés à partir d'une culture de 24 heures de chacun des organismes essayés sur le bouillon nutritif suivant :

Peptone bactériologique UCLAF	20 gr.
ClNa	5 gr.
Glucose anhydre pur	2 gr.
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³

pH = 7

Après un nouveau séjour de 18-20 heures à 37°, on mesure la longueur des zones bactériostatiques déterminées dans chaque cas.

1°) Mise en évidence de la production, par diverses souches de *B. subtilis*, de produits antimicrobiens diffusant dans la gélose

Le milieu nutritif dont nous nous sommes servi est constitué par de l'eau peptonée à 1,5 % et gélosée à 2 %.

Nous avons essayé un certain nombre de souches de *B. subtilis* dans les conditions citées ci-dessus; les longueurs des zones bactériostatiques vis-à-vis du *Staphylocoque Doré* (souche F.D.A. 209 P) et d'une souche de *Escherichia coli* ont été les suivantes :

Souches de <i>B. subtilis</i>	Longueur moyenne de la zone d'inhibition pour le <i>Staphylocoque</i> en mm.	Longueur moyenne de la zone d'inhibition pour <i>E. coli</i> en mm.
<i>B. subtilis</i> Pasteur	7	Atténué, non inhibé
<i>B. subtilis</i> MD 1	14	—
<i>B. subtilis</i> MD 2	14	—
<i>B. subtilis</i> Ungar	13	—
<i>B. subtilis</i> Foster-Woodruff	19	—
<i>B. subtilis</i> B ₂ Ciné	10	—
<i>B. subtilis</i> Champignon	7	—
<i>B. subtilis</i> Caron	14	environ 1 mm.
<i>B. subtilis</i> B 90	6	Atténué, non inhibé
<i>B. subtilis</i> SNCF	15	environ 2 mm.

Parmi toutes les souches essayées, c'est la souche *B. subtilis Foster-Woodruff* qui nous a fourni la zone d'inhibition du *Staphylocoque* la plus importante, et c'est elle qui a été choisie pour la réalisation de notre seconde série d'essais.

2°) Etude des spectres antibactériens présentés par les exosubtilines de cinq souches de subtilis

Nous avons établi un spectre antibactérien schématique pour les substances actives sécrétées par 5 souches différentes, en utilisant toujours la méthode décrite plus haut.

Les souches de *B. subtilis* qui ont été examinées sont les suivantes:

<i>B. subtilis</i> Foster-Woodruff	{	souches examinées dans la suite
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		de cette étude.
<i>B. subtilis</i> D.O.	{	souches qui nous ont été aimablement fournies par M. le Docteur Duché.
<i>B. subtilis</i> D.A.		
<i>B. subtilis</i> D.E.		

Le milieu gélosé qui a été employé a pour formule :

Peptone bactériologique UCLAF	15 gr.
Glucose anhydre pur	20 gr.
SO ⁴ Mn.OH ²	0,02 gr.
Gélose	20 gr.
Eau de ville	q.s.p. 1.000 cm ³

pH 6,5-7,0

Nous donnons ci-dessous la moyenne, lue sur 3 boîtes, des longueurs des zones d'inhibition déterminées vis-à-vis des germes sensibles essayés par les 5 souches de *B.subtilis** :

	Staphylococcus aureus FDA 209 P	Micrococcus Citreus ATCC 8411	Mycobacterium Phlei	E. Coli Monod	Tétragène
B. subt. F.W.	17,7	0	0	7,2	19,3
B. subt. ATCC 6633	17,4	15	18,6	0	15
B. subt. DO	15,8	16,6	22,7	3,7	21
B. subt. DA	21,4	0	0	5	10,5
B. subt. DE	20,5	0	11	10	25

	Klebsiella pneumoniae	B. paratyphique A. Lacasse	Entérocoque de Thiercelin	Bacillus mesentericus ruber	B. lactis aerogènes
B. subt. F.W.	0	0	0	5	4,7
B. subt. ATCC 6633	0	0	5,5	21	0
B. subt. DO	0	0	17	25-30	0
B. subt. DA	0	0	0	0	0
B. subt. DE	0	7	0	10	8

Ainsi qu'il ressort de ce tableau, les 5 souches essayées élaborent des substances différentes les unes des autres, diffusant dans la gélose, actives sur *Staphylocoque* et sur divers microbes. Seules les activités bactériostatiques sur *Staphylocoque* et sur *Tétragène*, plus ou moins marquées, sont communes aux 5 souches de *B.subtilis*.

* Certaines des souches sensibles utilisées ici et dans la suite de cette étude proviennent de l'American Type Culture Collection. Nous en devons un certain nombre d'autres à l'amabilité de M. Boyer, de l'Institut Pasteur. Nous remercions aussi bien vivement M. le Doyen Sartory et Mlle Lambin de la complaisance avec laquelle ils nous ont permis d'utiliser la collection de la Faculté de Pharmacie.

3°) Etude d'un milieu favorisant la production d'exosubtiline active sur staphylocoque par la souche Foster-Woodruff

Poursuivant notre travail avec la souche *B. subtilis* Foster-Woodruff, nous avons déterminé l'importance des zones d'inhibition du Staphylocoque obtenues avec divers milieux nutritifs, appliquant aux conclusions toutes les réserves déjà faites plus haut.

A) Influence du glucose et du manganèse.

Les mêmes essais que précédemment ont été reproduits, en ajoutant à notre milieu de base (eau peptonée gélosée) :

- a) 2 % de glucose anhydre pur,
- b) 0,02 % de $\text{SO}_4\text{Mn.OH}^2$,
- c) 2 % de glucose anhydre pur + 0,02 % de $\text{SO}_4\text{Mn.OH}^2$.

Les longueurs des zones d'inhibition déterminées ont été les suivantes :

Milieux essayés	Longueur moyenne des zones d'inhibition pour le Staphylocoque en mm.	Longueur moyenne des zones d'inhibition pour <i>E. coli</i> en mm.
1. Eau peptonée	19,5	Pousse presque nulle mais pas d'inhibition complète.
2. Eau peptonée glucosée	14,2	3
3. Eau peptonée glucosée + So_4Mn	19	6,5
4. Eau peptonée + So_4Mn	20,5	Pas d'inhibition complète mais pousse presque nulle sur environ 10 mm.

L'introduction de glucose dans le milieu diminue donc l'activité du produit antibiotique sur le Staphylocoque, soit en favorisant la croissance de ce dernier germe, soit en interférant dans le mécanisme d'action inhibitrice même; par contre, elle favorise l'apparition d'une activité bactériostatique petite mais certaine sur *Escherichia coli*. (FOSTER et WOODRUFF (41) ont signalé un fait analogue au cours de leurs essais sur la *Bacilline*).

B) Influence des sels minéraux.

Nous avons étudié l'influence de l'addition de certains sels minéraux sur la production d'exosubtiline.

Dans un milieu de base constitué par de l'eau peptonée à 1,5 %,

glucosée à 2 %, nous avons introduit les éléments minéraux suivants: SO_4Zn - SO_4Fe - SO_4Mn - SO_4Mg - ClK - SO_4Cu .

Nous avons préparé d'une part des milieux additionnés d'un des éléments ci-dessus, d'autre part un milieu contenant la totalité des mêmes composés essayés d'abord séparément.

Les résultats suivants ont été obtenus :

Milieux essayés	Longueur moyenne des zones d'inhibition pour le <i>Staphylocoque</i> en mm.	Longueur moyenne des zones d'inhibition pour <i>E. coli</i> en mm.
Milieu de base : eau peptonée, glucosée, gélosée à 2 % = MB	10,8	3,9
1. MB + 0,002 % $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{OH}_2$	12,3	5
2. MB + 0,002 % $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{OH}_2$	11	4,5
3. MB + 0,002 % $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{OH}_2$	14,3	6,5
4. MB + 0,05 % $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{OH}_2$	11,5	3
5. MB + 0,05 % ClK	6,5	3
6. MB + 0,001 % $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{OH}_2$	10,6	4,5
7. MB + la totalité des éléments essayés séparément	20,1	12

L'addition simultanée au milieu de ces divers éléments conduit à une zone d'inhibition sur *Staphylocoque* de 20 mm., alors que le milieu témoin peptone-glucose ne donne que 10,8 mm.

L'addition séparée de ces mêmes éléments ne conduit pas à des résultats sensiblement supérieurs à ceux du milieu témoin, sinon pour le sulfate de manganèse qui provoque un accroissement marqué de la zone d'inhibition du *Staphylocoque*, et aussi de la zone d'inhibition de *E. coli*.

Conclusions. — Il semble, d'après tous ces essais, que la production d'exosubtiline diffusible dans la gélose soit influencée d'une façon favorable par l'addition simultanée d'un ensemble de sels minéraux dont les actions se potentialisent. Seule l'action favorisante du manganèse est nettement visible lorsque l'on essaie ces divers sels minéraux séparément.

La présence du glucose accroît très nettement le développement du *B. subtilis*.

ETUDE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DES FILTRATS DE CULTURES DE *B. SUBTILIS*

Contrairement à notre attente, lorsque les diverses souches de *B. subtilis* examinées précédemment sont cultivées sur les mêmes bouillons qui, gélosés, permettent la production de substances antibiotiques diffusant dans la gélose, elles ne conduisent pas à des filtrats sur bougie Chamberland L3 présentant une activité correspondante. Après 2 à 10 jours de culture à 37°, nous n'avons obtenu aucun filtrat L3 actif sur Staphylocoque lorsqu'il était ajouté à une quantité égale de milieu nutritif ensemencé avec la souche de Staphylocoque Oxford.

Ces faits correspondent aux résultats obtenus par GRATIA et THIBAUT (50), d'après lesquels, pour les nombreuses souches du groupe *Subtilis-Mesentericus* examinées par ces auteurs, il n'y a pas, en milieu liquide, une production de substance active correspondant à la quantité qui semble produite sur milieu gélosé. Ceci pourrait être dû en partie, nous semble-t-il, à la séparation de la substance active d'avec des produits destructeurs ou interférants provenant du métabolisme des *B. subtilis*, et qui ne sont pas diffusibles dans la gélose. En outre, GRATIA et THIBAUT notent que la petite quantité de substance active produite en milieu liquide ne filtre pas, ou très peu, à travers les bougies Chamberland, et que des filtrats à peu près inactifs correspondent à des bouillons de culture qui, autoclavés 10 minutes, sont encore inhibiteurs à la dilution de 1/128.

Il faut penser également, dans le cas des essais sur milieux gélosés, à la possibilité d'un épuisement du milieu en principes nutritifs consécutif au développement du premier germe, épuisement qui rendrait ce milieu peu favorable à la croissance ultérieure des germes d'essai.

Quoi qu'il en soit, il nous a toutefois été possible de noter, pour les souches *Foster-Woodruff* et ATCC 6633, le passage à travers bougie L3 d'une petite quantité de substance inhibitrice au cours des toutes premières heures de culture; le filtrat sur bougie L3 obtenu à ce moment contient un produit actif diffusant dans la gélose, et que l'on peut doser par le procédé par diffusion sur plaques au Staphylocoque, adopté par la Food and Drug Administration pour le dosage de la Pénicilline. C'est la production de cette petite quan-

tité de substance antibiotique, traversant les bougies Chamberland L3, que nous avons étudiée au cours des essais qui suivent. L'appréciation en a été effectuée au moyen de la méthode par diffusion utilisée d'une manière générale pour le dosage de nombreux antibiotiques.

Nous exposons tout d'abord la méthode que nous avons utilisée pour préparer et doser cette exosubtiline filtrant à travers bougie L3, puis étudions les conditions de production de cet antibiotique. Au cours de ce second temps, nous avons établi, sur le milieu type glucose-peptone-sels minéraux, dont la formule a été choisie à l'aide des essais précédemment effectués par le procédé des stries croisées, l'évolution de cette production d'exosubtiline filtrable à travers bougie L3 pour des incubations à diverses températures; puis nous avons cherché à préciser l'influence, sur cette production, de certaines modifications dans la formule du milieu type.

La majeure partie de nos essais a été effectuée avec la souche *B. subtilis* Foster-Woodruff. De nombreuses autres expériences ont toutefois pu nous montrer une production analogue de substance filtrable, active sur Staphylocoque, par la souche ATCC 6633.

TECHNIQUES D'ESSAI

Conditions de culture. — Les milieux préparés sont répartis en boîtes de Roux par 200 cc, puis stérilisés par un passage de 20 à 25 minutes à l'autoclave à 120°. L'ensemencement est réalisé en introduisant dans chaque boîte de Roux 0,5 cc d'une suspension en eau distillée d'une culture sur gélose inclinée incubée 24 heures à 37°. Les boîtes de Roux ensemencées sont alors placées à l'étuve à 37°.

Prélèvements. — *Préparation des filtrats actifs.* — Chaque prélèvement est constitué par la production de 4 boîtes de Roux, dont le mélange est filtré sur bougie Chamberland L3. C'est ce filtrat dont on dose l'activité antibiotique.

Mesure des pH. — Les pH sont déterminés au moyen de la méthode électrométrique. L'appareil utilisé est un pH-mètre construit par la Cambridge Instrument Company.

Dosage des substances réductrices. — Le dosage des substances réductrices, que l'on exprime en glucose, est effectué par la méthode de Somogyi (119-120).

Dosage de l'exosubtiline filtrable à travers bougie L3. — Pour permettre l'étude de l'évolution, sur les divers milieux essayés, de la production de substance active filtrable à travers bougie Cham-

berland L3, il était nécessaire d'utiliser un procédé simple d'appréciation de la quantité formée de cet antibiotique. Dans ce but, nous avons eu recours à la méthode de titrage par diffusion sur des plaques gélosées ensemencées par une couche sensible de Staphylocoque, procédé utilisé communément pour l'estimation du titre des antibiotiques diffusibles dans la gélose.

Dans des anneaux fixés sur des boîtes de dosage préparées (boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, contenant une couche de base constituée par 17 cm³ de milieu nutritif gélosé, et une couche de surface de 3,5 cm³ du même milieu ensemencé avec le Staphylocoque), on introduit les filtrats à doser, amenés par dilution à un titre convenable, et d'autre part des solutions actives servant d'étalons. On laisse incuber environ 15 heures à l'étuve à 37° avant la lecture des auréoles d'inhibition.

Ici, chaque produit à doser a été placé sur 6 boîtes. On a retenu la moyenne des lectures des diamètres des 6 auréoles d'inhibition déterminées. Sur chaque boîte de dosage a été placée, comme référence, une solution-étalon de Pénicilline titrant 1 unité par cm³.

On a adopté, comme unité d'Exosubtiline, *la quantité qui, dans les mêmes conditions de diffusion et d'incubation, détermine, sur des boîtes de dosage ensemencées avec le Staphylocoque, une auréole d'inhibition moyenne égale à celle donnée par une solution de Pénicilline titrant 1 unité par cm³.*

La comparaison du titre des solutions inconnues est faite avec cet étalon d'après une courbe traduisant la relation du diamètre des zones d'inhibition avec les logarithmes des concentrations en produit actif. Cette courbe semi-logarithmique est une droite. La pente de cette droite, c'est-à-dire pratiquement la différence des diamètres des zones d'inhibition pour des concentrations en produit actif allant du simple au double, varie avec chaque antibiotique; pour l'Exosubtiline, elle est en général de 2,5 à 3 mm. dans les zones utilisables.

Pour doser le titre d'un filtrat actif, nous établissons donc : le diamètre moyen des auréoles d'inhibition qu'il détermine, le diamètre moyen des auréoles correspondant à la solution-étalon de Pénicilline titrant 1 unité par cm³, titrée dans les mêmes conditions, puis nous nous servons de la courbe-étalon pour en tirer le nombre d'unités d'Exosubtiline contenues dans le produit à doser.

Précision obtenue dans l'appréciation de l'activité des filtrats actifs. — Des séries de 40 boîtes de Roux ont été préparées, et, après incubation convenable à 37°, mélangées par 4 boîtes et filtrées. Les 10 filtrats ont alors été essayés par la méthode de dosage précédemment décrite.

Les résultats ont été les suivants :

1^{re} série : 1,81 - 1,82 - 1,89 - 1,79 - 1,64 - 1,79 - 1,68 - 1,81 - 1,89 - 1,79

Moyenne : 1,79

Ecart maximum : 1,89 — 1,64 = 0,25

$$0,25 \times 100$$

Marge d'imprécision : $\frac{\quad}{1,79} = 13 \%$

2^{er} série : 1,64 - 1,42 - 1,46 - 1,49 - 1,52 - 1,40 - 1,25 - 1,26 - 1,25 - 1,37

Moyenne : 1,40

Ecart maximum : 1,64 — 1,25 = 0,39

$$0,39 \times 100$$

Marge d'imprécision : $\frac{\quad}{1,40} = 27 \%$

3^{er} série : 1,77 - 1,57 - 1,34 - 1,44 - 1,67 - 1,68 - 1,76 - 1,56 - 1,42 - 1,50

Moyenne : 1,57

Ecart maximum : 1,77 — 1,34 = 0,43

$$0,43 \times 100$$

Marge d'imprécision : $\frac{\quad}{1,57} = 27 \%$

Il résulte de ceci qu'une différence de production de substance active entre divers milieux essayés simultanément ne peut être retenue que si elle égale ou excède 30 %, dans les conditions d'expérience utilisées ici.

1°) Essais conduits avec la souche B. Subtilis Foster-Woodruff

Etude des milieux de production

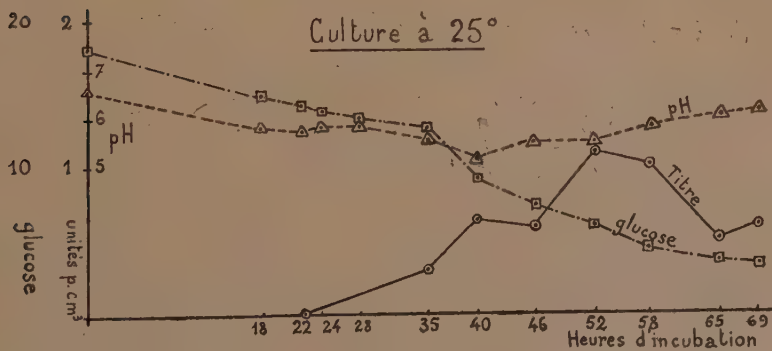
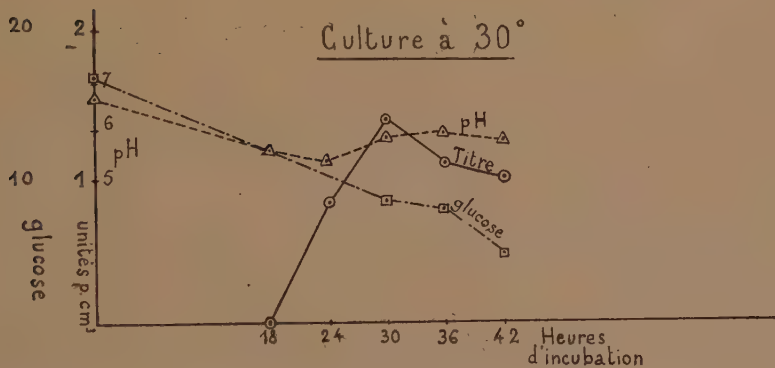
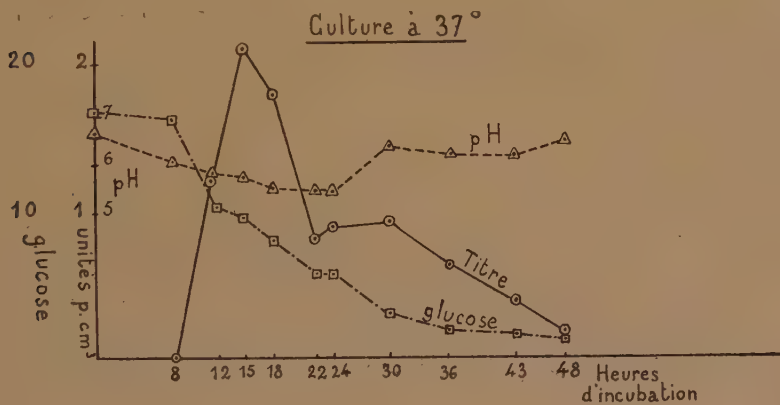
I. — CONDITIONS GÉNÉRALES DE CULTURE SUR UN MILIEU-TYPE

Ainsi que nous l'avons déjà indiqué, nous avons adopté comme milieu-type un milieu de base glucose-peptone additionné de sels minéraux, présentant la composition suivante :

formule	Glucose anhydre pur	20	gr.
n° 781	Peptone bactériologique UCLAF	15	gr.
	SO ⁴ Zn. 7 OH ²	0,02	gr.
	SO ⁴ Fe. 7 OH ²	0,02	gr.
	SO ⁴ Mn. OH ²	0,02	gr.
	SO ⁴ Cu. 5 OH ²	0,01	gr.
	SO ⁴ Mg. 7 OH ²	0,50	gr.
	Cl K	0,50	gr.
	Eau de ville	q.s.p.	1.000 cm ³
	pH = 6,5 à 6,8		

*Evolution du pouvoir antibiotique des filtrats sur bougie L³
de diverses cultures de la souche B.subtilis Foster-Woodruff*

(On indique également l'évolution parallèle du pH du milieu de culture, ainsi que la teneur en glucose non consommé).



La rapidité et la fugacité de la production d'exosubtiline filtrable sur ce milieu nous ont obligée à effectuer sur nos essais plusieurs prélèvements à intervalles de quelques heures, pour déterminer les courbes d'évolution correspondant aux diverses conditions de culture.

L'évolution de la production de substance active a été établie pour ce même milieu après incubations respectives à 37°, à 30°, et à 25°. Outre l'activité antibiotique, nous avons déterminé sur chaque prélèvement le pH et la quantité de substances réductrices exprimée en glucose.

L'évolution de l'exosubtiline établie au cours de nos essais est la suivante :

Température d'incubation	Heures d'incubation	pH	Titres moyens des filtrats L ₃ en unités par cm ³	Substances réductrices exprimées en glucose en gr. par litre
37°	0	6,65	0	17,2
	8	6,05	0	16,45
	12	5,75	1,22	10
	15	5,75	2,1	9,7
	18	5,5	1,80	8
	22	5,45	0,82	5,58
	24	5,45	0,92	5,56
	30	6,35	0,94	3,22
	36	6,25	0,64	2,03
	43	6,25	0,38	1,45
	48	6,45	0,15	1,19
30°	0	6,65	0	17,2
	18	5,65	0	
	24	5,35	0,85	
	30	5,8	1,40	8,47
	36	5,95	1,12	7,9
	42	5,85	1	4,4
25°	0	6,6	0	18
	18	5,8	0	14,7
	22	5,7	0	14,3
	24	5,8		
	28	5,8	Traces	13,9
	35	5,5	Traces	13,1
	40	5,15	0,28	12,4
	46	5,45	0,64	8,9
	52	5,5	0,60	7,5
	58	5,75	1,12	6,2
	65	5,95	0,98	4,4
			0,52	3,7
	69	6,15	0,6	3,3

De l'observation de ces résultats, nous tirons les conclusions suivantes : au début de la culture de notre souche sur le milieu considéré, il apparaît une petite quantité de substance active filtrant à travers bougie L₃; c'est à 37° que nous avons pu noter la production la plus importante d'exosubtiline, mais c'est aussi à cette température qu'elle se présente de la manière la plus fugace. Le titre

maximum est obtenu au bout de 15 à 18 heures d'incubation. Il commence très rapidement à s'abaisser, alors que la culture continue à évoluer et que sont élaborés vraisemblablement des produits du métabolisme destructeurs de la substance active.

D'autre part, l'étude des fractions antibactériennes non filtrables ou éventuellement fixées sur bougies Chamberland (il est bien connu que de nombreuses substances organiques de sécrétion sont retenues par les bougies) s'impose. Nous nous proposons de l'effectuer par la suite.

II. — ETUDE DE QUELQUES MODIFICATIONS DU MILIEU DE CULTURE.

Les études suivantes ont été effectuées en partant de notre formule-type n° 781 (voir page 30).

A) Modification du taux de glucose.

Le taux de glucose ramené à 10 grammes par litre est moins favorable à la production d'exosubtiline : nous avons obtenu dans un essai 0,7 unité par cm^3 au bout de 15 heures, alors qu'un témoin mené parallèlement sur le milieu à 20 grammes par litre a donné 3,2 unités par cm^3 dans le même temps.

Par contre, une augmentation de la production de glucose semblerait légèrement favorable. Sur milieux à 30 grammes de glucose par litre, nous avons obtenu : 2,9 — 3,4 unités par cm^3 ; sur milieux à 40 grammes de glucose par litre : 2,45 — 4 — 3,1 unités par cm^3 . L'action favorisante n'est toutefois pas établie d'une manière indiscutable.

B) Emploi de divers sucres dans le milieu de culture.

Les sucres suivants ont été essayés : glucose, saccharose, lactose, sorbose, maltose, introduits uniformément à la dose de 20 grammes par litre dans le milieu de culture.

C'est le glucose qui a donné les meilleurs résultats au cours de nos essais. Ainsi nous obtenons dans l'essai suivant :

Sucres contenus dans les milieux d'essai	Titre du filtrat (unités par cm^3) après :		
	15 heures d'incubation à 37°	18 heures d'incubation à 37°	20 Heures d'incubation à 37°
Glucose	1,78	1,18	1,20
Saccharose	0,35	Traces	Traces
Lactose	0	0	0
Sorbose	0	0	0
Maltose	Traces	0,35	0,32

Après le glucose, le saccharose et le maltose produisent des titres à peu près équivalents entre eux, mais très inférieurs à ceux obtenus sur milieu glucosé, alors que le sorbose et le lactose ne se prêtent pas du tout à une production d'antibiotique.

Nous avons également essayé des milieux contenant comme éléments nutritifs hydrocarbonés des mélanges glucose + saccharose en diverses proportions. Des milieux à 5 grammes par litre de glucose additionnés de 10 ou 20 grammes par litre de saccharose ne nous ont pas donné des résultats supérieurs à ceux obtenus sur milieux au saccharose seul. Avec un milieu contenant 20 grammes par litre de glucose + 20 grammes par litre de saccharose, nous avons obtenu des titres équivalents mais non supérieurs à ceux qui ont été produits parallèlement sur un milieu contenant uniquement 20 grammes par litre de glucose.

C) *Modifications de la proportion des éléments minéraux.*

Nous avons multiplié les proportions de l'ensemble des sels minéraux par 2, par 5 et par 10.

Le milieu contenant le double des sels minéraux donne des titres comparables à ceux produits avec la formule simple, mais toutefois légèrement inférieurs. L'ensemble des sels multiplié par 5 conduit à des résultats nettement inférieurs, tandis que le milieu contenant une proportion 10 fois supérieure en sels ne donne qu'une production à peu près nulle d'exosubtiline.

Nous avons alors essayé de faire varier séparément divers éléments du milieu.

Des milieux contenant 0,05 gr. par litre de $\text{SO}_4 \text{Fe}$ ou $\text{SO}_4 \text{Zn}$ ne montrent pas de variation appréciable de la production d'antibiotique, alors qu'une proportion de 0,20 gr. par litre de ces mêmes éléments se montre nettement défavorable.

L'ensemble $\text{SO}_4 \text{Zn}$, $\text{SO}_4 \text{Fe}$, $\text{SO}_4 \text{Mn}$, multiplié par 2, ne provoque pas de variation; multiplié par 5, à plus forte raison par 10, il conduit à des résultats nettement inférieurs.

La proportion de Cl K ramenée à 0,25 gr. par litre ne provoque pas de différence sensible, alors qu'un taux de 0,10 gr. du même produit ne permet d'obtenir que des résultats inférieurs.

D. — *Comparaison de la valeur de divers éléments azotés.*

Sur notre formule de base n° 781 précédemment citée (p. 30), nous avons comparé la valeur des produits azotés suivants, intro-

duits respectivement à la dose de 15 grammes par litre de milieu :

- Peptone bactériologique UCLAF,
- Peptone VAILLANT 5 B,
- Peptone pancréatique de caséine UCLAF,
- Tryptone DIFCO,
- Extrait de viande LIEBIG.

Les résultats obtenus sur milieu à la peptone pancréatique de caséine sont égaux ou même légèrement supérieurs à ceux obtenus sur milieu à la peptone bactériologique UCLAF (peptone utilisée, à moins d'indications spéciales, au cours de tous nos essais). Les titres trouvés sur milieu à la peptone VAILLANT sont un peu inférieurs ou sensiblement égaux à ceux trouvés sur milieu à la tryptone. Sur milieu à l'extrait de viande LIEBIG, nous n'avons abouti au cours de nos essais qu'à des chiffres peu intéressants.

Voici par exemple l'évolution d'un essai-type :

Milieux essayés	Titre du filtrat (unités par cm ³) après :		
	15 heures d'incubation à 37°	18 heures d'incubation à 37°	21 heures d'incubation à 37°
1. Formule 781 avec peptone bactériologique UCLAF (15 gr. par litre)	1,86	0,88	1,20
2. Formule 781 avec peptone VAILLANT 5B (15 gr. par litre)	0,94	0,89	0,81
3. Formule 781 avec peptone pancréat. de caséine UCLAF (15 gr. par litre)	1,57	1,23	1,75
4. Formule 781 avec tryptone DIFCO (15 gr. par litre)	1,21	0,90	1,19
5. Formule 781 avec extrait de viande LIEBIG (15 gr. par litre)	Traces	0,5	0,5

E) Addition d'asparagine.

Le milieu n° 781 a été additionné de : 1, 2, 3 grammes d'asparagine par litre. Nous n'avons pas noté de différences sensibles entre les titres de ces milieux et les milieux-témoins.

F) Addition d'acide glutamique et d'asparagine aux milieux de culture.

L'addition de 1 ou 5 grammes par litre d'acide glutamique à la formule n° 781 ne produit pas de différence significative dans les titres obtenus après 15 et 18 heures d'incubation à 37° :

Milieux essayés	Titres (unités par cm ³) après incubation à 37° pendant :	
	15 heures	18 heures
1. Formule 781 — Témoin	3,4	2,1
2. Formule 781 + 1 ‰ ac. glutamique	3,7	2,6
3. Formule 781 + 5 ‰ ac. glutamique	4	2,6

L'addition simultanée d'ac. glutamique et d'asparagine n'améliore pas non plus nettement le titre obtenu.

En conclusion, au cours des essais effectués sur la modification de notre formule-type, nous avons pu observer que, des 5 sucres employés, c'est le glucose qui se trouve le plus favorable à la production de substance active; il permet d'obtenir les meilleurs résultats lorsqu'il est utilisé à la dose de 20 à 40 grammes par litre.

Il n'y a pas d'intérêt à changer la proportion des éléments minéraux telle que nous l'avons employée.

Les éléments azotés complexes ont leur importance; les diverses peptones essayées ne nous ont pas donné les mêmes résultats, les meilleurs taux ayant été obtenus avec une peptone pancréatique de caséine ou la peptone bactériologique UCLAF.

L'addition d'asparagine ou d'un mélange asparagine-acide glutamique ne change pas sensiblement les taux d'antibiotique obtenus.

2°) Production d'exosubtiline filtrable par la souche *B. subtilis* ATCC 6633

Culture sur milieu-type.

Comparaison avec la souche B.subtilis Foster-Woodruff.

Nous avons pu constater que, dans les mêmes conditions de culture que précédemment, la souche *B.subtilis* ATCC 6633 produit d'une manière analogue une substance active sur Staphylocoque, filtrable à travers bougie Chamberland L3.

Des cultures ont été effectuées sur notre milieu-type comparativement avec les souches Foster-Woodruff d'une part, ATCC 6633 d'autre part. Nous donnons ci-dessous les évolutions respectives de l'activité sur Staphylocoque présentée par les filtrats sur bougie L3

de chacune des cultures correspondant aux 2 souches citées plus haut :

Heures d'incubation à 37°	B. subt. Foster-Woodruff		B. subt. ATCC 6633	
	pH	Activité unités par cm ³	pH	Activité unités par cm ³
0	6,55	0	6,55	0
15	5,35	1,26	5,45	1,47
18	5,35	1	5,45	0,78
21	5,65	0,74	5,6	0,77
23		0,75		0,47

Dans d'autres essais, l'activité sur *Staphylocoque* des cultures de la souche ATCC 6633 a paru évoluer un peu plus lentement.

Les titres maxima obtenus au cours de diverses cultures avec cette souche ont été les suivants : 1,47 - 1,6 - 2 - 3,3 - 3,4 - 2,9 - 2 (unités par cm³).

Avec la souche Foster-Woodruff, les titres maxima relevés comparativement dans différents essais effectués sur divers lots du même milieu ont été les suivants : 2,6 - 2,1 - 3,2 - 1,65 - 2,9 - 2,85 - 2,4 - 3,95 - 2,4 - 1,75 (unités par cm³).

Emploi de divers sucres dans le milieu de culture.

Des cultures ont été réalisées sur milieu de formule n° 781, mais où le glucose avait été remplacé soit par une même quantité de saccharose, soit par une même quantité de maltose.

Les évolutions suivantes ont pu être observées :

Heures d'incubation à 37°	Milieu-témoin au glucose		Milieu au saccharose		Milieu au maltose	
	pH	Activité - unités par cm ³	pH	Activité unités par cm ³	pH	Activité unités par cm ³
0	6,55		6,55		6,6	
16	5,45	2,8	5,3	0,37	6,15	< 0,2
24	5,7	1,17	5,5	0,3	6,0	Traces
39	5,95	0,5	6,1	Traces	6,2	Traces
48	6,1	0,3	6,2	Traces	6,35	Traces

Nous constatons ainsi une complète analogie avec les résultats obtenus sur milieux contenant les sucres correspondants à partir de la souche *B. subtilis Foster-Woodruff*.

*Etude de l'activité de l'exosubtiline produite par la souche
B.subtilis ATCC. 6633*

Les filtrats L3 des cultures de la souche ATCC 6633 présentent une activité inhibitrice non seulement sur *Staphylocoque*, mais aussi sur *Micrococcus conglomeratus* et *Streptococcus fecalis*, ainsi que nous l'avons établi; d'autre part nous avons vu qu'ils n'avaient pas d'action sur *Escherichia coli*.

Technique utilisée. — Cet essai a été effectué à l'aide de la méthode par diffusion sur milieu gélosé.

Nous avons préparé des boîtes analogues en tous points aux boîtes servant au dosage à l'aide du *Staphylocoque*, dont la description est faite plus haut, mais où la première couche de 3,5 cm³ de milieu nutritif était ensemencée avec les germes à essayer. Des anneaux de verre ont été fixés par le procédé habituel sur les surfaces gélosées, et, après introduction du filtrat actif dans les anneaux et incubation à 37°, les dimensions des auréoles d'inhibition ont été mesurées.

L'essai effectué avec le filtrat d'une culture de 18 heures, titrant 1,9 unité par cm³, nous a donné des auréoles d'inhibition présentant les diamètres suivants :

Germes essayés	Diamètres moyens des auréoles d'inhibition en mm.
<i>Micrococcus conglomeratus</i>	20
<i>Streptococcus fecalis</i>	31,3
<i>Escherichia coli</i>	0

Ainsi qu'il ressort de ce tableau, la substance antibiotique est active sur *M.conglomeratus*, bien plus sur *Streptococcus fecalis*, pas du tout sur *E.coli*.

CONCLUSION

Les essais effectués au cours de cette première partie ont montré que la production d'une substance diffusant dans le milieu de culture et possédant des propriétés bactériostatiques vis-à-vis du *Staphylocoque* était un phénomène commun à de nombreuses souches de *B.subtilis*. Les exosubtilines produites ne sont pas les mêmes, leur nature varie suivant les souches qui les élaborent. Cinq exosubtilines

produites sur milieu gélosé par 5 souches différentes de *B.subtilis* présentent sur 10 germes des spectres d'activité antibactérienne dissemblables.

L'examen de l'élaboration d'exosubtiline filtrable à travers bougie Chamberland L3 a été effectué sur les bouillons de culture pour 2 des 5 souches que nous venons de citer, les souches *Foster-Woodruff* et *ATCC 6633*. Nous avons pu observer que leur production était assurée par des conditions de culture analogues au cours de nos essais.

En particulier nous avons pu constater que la souche *B.subtilis ATCC 6633*, dont l'étude de l'Endosubtiline constituera la seconde partie de notre travail, produisait une exosubtiline active sur *Staphylocoque* au cours des premières heures de sa culture sur bouillon glucosé, peptoné, et additionné de divers sels minéraux. Cette production est rapide et fugace; elle atteint son maximum au bout de 15 à 18 heures et le titre des filtrats décroît rapidement ensuite. Elle a lieu sur milieu glucosé; sur milieu au saccharose, elle se montre très inférieure, et insignifiante sur milieu au maltose.

DEUXIEME PARTIE

PRODUCTION D'ENDOSUBTILINE
PAR LA SOUCHE
BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633

La souche de *B. subtilis* ATCC 6633 précédemment citée possède la propriété de former une Endosubtiline, substance active que l'on peut, suivant certaines conditions, retirer des corps microbiens.

Cette Endosubtiline a tout d'abord été mise en évidence par JANSEN et HIRSCHMAN (59); son activité fut examinée en partie par SALLE et JANN (109 à 113). Depuis, sa production et son extraction ont été étudiées par de nombreux microbiologistes, en particulier les chercheurs américains du Western Regional Research Laboratory, Albany, California, et ceux du Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois *. Un exposé de ses propriétés connues a été publié dernièrement par HASSAL (51).

L'endosubtiline est retirée des corps microbiens. Après diverses purifications, elle se présente sous la forme d'une poudre chamois clair, relativement soluble dans l'eau mais précipitant en présence d'électrolytes (en solution physiologique à 8 ‰ de Cl Na, la solubilité du lot que nous avons examiné n'est que de 0,3 à 0,4 mgr par cm³). Elle diffuse dans la gélose, est digérée par les ferments protéolytiques. Non inhibée par l'acide para-amino-benzoïque, elle est faiblement sensible à l'action de la cystéine.

Aussi, bien *in-vivo* qu'*in-vitro*, elle possède des propriétés antagonistes marquées vis-à-vis de certains germes, en particulier le Staphylocoque, le Pneumocoque, le Streptocoque viridans, et surtout le Streptocoque hémolytique.

Nous examinons ici les conditions de culture dans lesquelles nous avons pu aboutir à la formation d'Endosubtiline par la souche productrice. Dans un second temps, nous étudions quelques propriétés ainsi que divers aspects de l'activité remarquable de cet antibiotique.

* Nous remercions bien vivement les chercheurs du Western Regional Research Laboratory des renseignements qu'ils nous ont aimablement communiqués.

CONDITIONS DE PRODUCTION DE L'ENDOSUBTILINE

Comme les autres antibiotiques, l'Endosubtiline peut être obtenue suivant deux techniques : un procédé de culture en surface, et un procédé de culture en profondeur.

Dans le premier procédé, les cultures sont effectuées en boîtes de Roux, et ce sont les voiles microbiens qui, séparés, sont traités exclusivement et conduisent à la substance active. Dans le second, les mêmes milieux de culture sont introduits en fioles d'Erlenmeyer placées sur table à secousses, ou en appareils avec agitation et insufflation d'air; la culture obtenue est alors homogène, et l'extraction est faite soit sur un culot de centrifugation, soit sur la culture totale.

Nous avons étudié en particulier la production en surface. Mais une certaine quantité de Subtiline a également été obtenue en profondeur. L'étude des spectres antibactériens a pu nous permettre de conclure à une identité d'activité des deux produits.

Techniques d'essai

ORGANISME.

La souche que nous utilisons est le *Bacillus subtilis* ATCC 6633, que nous avons reçue du Lister Institute. Elle correspond à la souche n° 231 du N R Smith, Bureau of Plant Industry, United States Department of Agriculture, dont JANSEN et HIRSCHMAN les premiers mirent en évidence les propriétés antibiotiques; elle est également entretenue dans la collection du Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois (n° B-543).

Nous conservons en glacière des cultures de cette souche sur milieu II de SCHMIDT et MOYER (118). Pour tous les repiquages suivants, nous additionnons le milieu II de 0,15 % de $\text{SO}_4 \text{ Mn. OH}^2$;

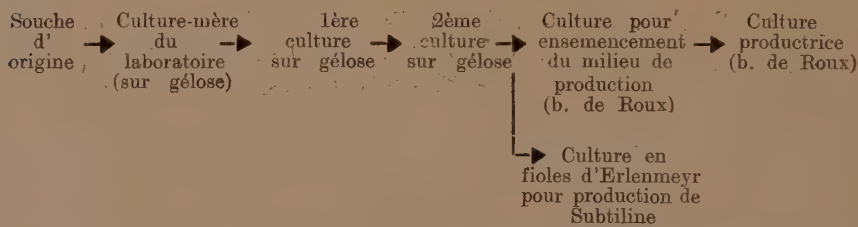
ceci nous permet d'obtenir une culture plus riche et d'aspect plus rugueux.

Il nous semble, en effet, sans que nous ayons jusqu'ici approfondi la question d'une manière très précise, que l'on ait avantage à utiliser des souches R, celles-ci conduisant à une culture beaucoup plus florissante et permettant une production d'endosubtiline beaucoup plus abondante que les souches S.

PRÉPARATION D'UN INOCULUM ET ENSEMENCEMENT DES MILIEUX DE CULTURE.

Nous partons d'une souche-mère conservée en glacière, obtenue par un repiquage du tube d'origine sur une gélose inclinée de milieu II. Chaque semaine, un repiquage de cette souche-mère nous donne une nouvelle culture, dont nous repartons pour l'ensemencement de tous nos essais. Cette dernière culture, réensemencée sur milieu II gélosé, après une incubation de 24 heures à 37°, sert soit à ensemer une culture primaire en boîte de Roux du milieu d'essai qui, après 24 heures d'incubation à 37°, constituera l'inoculum proprement dit conduisant à la culture-production en boîtes de Roux, soit à ensemer des fioles d'Erlenmeyer de milieu de culture qui, placées sur table à secousses et maintenues à 37°, conduiront à une production de Subtiline en profondeur.

Nous, suivons donc les étapes suivantes, pour l'ensemencement de nos cultures :



Les ensemencements sur gélose inclinée sont effectués en stries, à l'aide d'une anse de platine. Les cultures primaires sont ensemencées à raison de 5 cm² de culture sur gélose pour 100 cm³ de milieu liquide. Les cultures secondaires, de production, sont ensemencées à raison de 1 % de culture primaire.

CULTURES PRODUCTRICES DE SUBSTANCE ANTIBIOTIQUE.

Les cultures en surface ont été effectuées en boîtes de Roux de 1 litre, à raison de 150 cm³ par boîte. Les milieux, une fois répartis, ont été stérilisés à l'autoclave durant 20 à 25 minutes à 120-123°.

Après refroidissement, on ensemence à raison de 1,5 cm³ de culture primaire par boîte de Roux. Les cultures sont alors mises en incubation à l'étuve à 37°.

Dans le procédé en profondeur, les milieux sont répartis par 70 cm³ en fioles d'Erlenmeyer de 300 cm³. Même stérilisation et même taux d'ensemencement que dans le procédé en surface.

PRÉLÈVEMENTS ET ESTIMATION DE L'ACTIVITÉ.

Chaque essai en surface est constitué par le produit de 20 boîtes de Roux au minimum. Les voiles séparés sont essorés, pesés et traités par l'alcool éthylique à 75 %.

On prépare les échantillons à doser selon les indications du WRRL, en ajoutant aux cellules humides environ 3 fois leur volume d'alcool à 95°, ce qui réalise une concentration de 70-75 % en éthanol.

On acidifie avec 1 % d'acide acétique crist., on agite et on laisse reposer une nuit en glacière. Au bout de ce temps, l'activité est estimée par la méthode turbidimétrique.

Dans le cas des cultures en profondeur, 1 partie de culture totale est additionnée de 3 parties d'éthanol; le mélange est acidifié jusqu'à pH 2,5-3,0 avec Cl H. Après agitation d'une heure environ, le titrage du filtrat permet l'appréciation de la teneur de la culture en Subtiline.

Au début de nos travaux, nous avons adopté comme unité *la quantité de Subtiline qui, dissoute dans 50 cm³ de milieu tamponné, permettait l'inhibition en 5 heures du développement de la souche de Staphylocoque FDA 209 P, ensemencée à raison de 2,5 %, dans les conditions de travail de la méthode turbidimétrique.* Des variations importantes ayant été observées dans la détermination de cette quantité, nous avons étudié une standardisation et avons finalement adopté comme unité : *1/140^e de mgr d'une des premières préparations de Subtiline purifiée, constituant le lot Dp 1759 (qui sera décrit Join).*

Milieux utilisés pour la production d'endosubtiline

JANSEN et HIRSCHMAN (59) ont effectué leurs premières recherches sur des milieux synthétiques, en vue d'étudier l'influence de divers éléments sur le développement du microbe et sur la production de substance antibiotique. Le milieu de base qu'ils ont utilisé était le suivant :

SO ¹ Mg. 7 OH ²	0,5 gr.
Cl K	0,5 gr.
PO ¹ H ² K	1 gr.
Saccharose	30 gr.
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³

En ce qui concerne les sels métalliques, ces auteurs ont mis en évidence l'action favorable du manganèse. Comme source d'azote, ils utilisèrent avec un égal succès l'asparagine, l'acide glutamique ou l'acide aspartique, et obtinrent un développement plus faible avec l'urée ou les sels ammoniacaux.

Des essais effectués par certains groupes de chercheurs du WRRL et du NRRL (58-75-122) aboutirent à une très bonne production sur un milieu de culture préparé à partir de concentrés de jus d'expression des tiges d'asperges; les meilleurs résultats furent obtenus sur un concentré préparé par le procédé de digestion (74-134-135-136). Des taux supérieurs furent toutefois obtenus sur un milieu à 25 % de mélasse, additionné de 0,8 % de PO¹H (NH¹)² et 50 parties par million de Mn (sous forme de sulfate), mais les éléments entrant dans la composition de ce dernier milieu gênent l'extraction du produit actif.

Au cours d'études sur milieux synthétiques, les mêmes chercheurs ont pu établir des données intéressantes concernant certains éléments nutritifs indispensables pour une production optima d'antibiotique (32 à 35). Il résulte de ces travaux qu'une source appropriée d'hydrates de carbone et certains taux d'éléments minéraux suffisent à assurer le développement du *B. subtilis* et la production de substance antibiotique. 5 à 15 % de saccharose favorisent une bonne formation de produit actif. Le glucose, le fructose, le galactose, le xylose, le mannitol, le glycérol et le maltose permettent une aussi bonne croissance que le saccharose. Toutefois, le glycérol seul conduit à une activité antibiotique comparable à celle qui est obtenue avec ce dernier. Le glucose et le maltose ne permettent d'obtenir que des rendements inférieurs, tandis que des titres très faibles sont obtenus avec les autres sucres. En ce qui concerne les éléments minéraux les taux suivants (en parties par million) semblent optima : N 1.000 - P 150 - K 125 - S 80 - Mg 2,5 - Fe 1,2 - Mn 0,7 - Zn 0,5. N peut être fourni par diverses sources : les acides glutamique et aspartique, NH³, NO³K. NO³Na, conviennent parfaitement, alors que la bétaine, l'urée, l'uréthane, se montrent moins bons ; SO¹(NH¹)² ne convient pas, probablement par suite de l'acidification résultant de l'utilisation du cation.

Personnellement nous avons réalisé nos préparations de Subtiline

d'une part sur le milieu synthétique suivant, qui constitue notre formule n° 877 :

Saccharose	100	gr.							
Asparagine	2	gr.							
Acide glutamique	2	gr.							
Acide citrique	0,5	gr.							
SO ⁴ Na ² anhydre	4	gr.							
PO ⁴ H (NH ⁴) ²	8	gr.							
ClNa	0,3	gr.							
ClK	0,186	gr.	soit	100	parties	pour	1	million	
SO ⁴ Fe.7OH ²	0,02	gr.	»	4	»	»	»	(en cation)	
SO ⁴ Mn.OH ²	0,15	gr.	»	50	»	»	»	»	
SO ⁴ Mg.7OH ²	0,50	gr.	»	50	»	»	»	»	
SO ⁴ Zn.7OH ²	0,009	gr.	»	2	»	»	»	»	
Eau distillée	q.s.p.	1 litre							
	pH =	6,7-6,8							

D'autre part, nous avons utilisé 2 autres principales formules l'une (n° 891) obtenue en remplaçant les 2 grammes d'asparagine de la formule précédente par 0,45 gr. d'urée, l'autre (n° 903) obtenue en remplaçant le saccharose et les éléments azotés de la formule n° 877 par 200 grammes de mélasse et 8 grammes de PO⁴H (NH⁴)², cette dernière formule correspond d'ailleurs au milieu mélasse-phosphate cité par le WRRL, additionné de sels minéraux.

Formule 903 :	Mélasse	200	gr.
	PO ⁴ H (NH ⁴) ²	8	gr.
	Acide citrique	0,50	gr.
	SO ⁴ Na ² anhydre	4	gr.
	ClNa	0,3	gr.
	ClK	0,186	gr.
	SO ⁴ Fe.7OH ²	0,02	gr.
	SO ⁴ Mn.OH ²	0,15	gr.
	SO ⁴ Mg.7OH ²	0,50	gr.
	SO ⁴ Zn.7OH ²	0,009	gr.
	Eau distillée	q.s.p. 1 litre	
pH = 6,7-6,8			

La récolte a été effectuée d'une manière générale au bout de 2 jours d'incubation.

Avant d'adopter ces formules, nous avons effectué de nombreux essais, dont nous citons ici les principaux en même temps que nous relatons les productions obtenues sur les 3 milieux cités ci-dessus.

Etude de quelques milieux de production de subtiline

ETUDE DE LA FORMULE N° 877 :

Initialement, nous sommes partis de la formule n° 877 citée plus haut. Nous avons vu tout d'abord qu'à 37° et dans nos conditions de culture, une production maxima était obtenue au bout de 40 à 45 heures, et que le titre se conservait 2 jours environ. Un certain nombre de cultures effectuées dans ces conditions nous ont permis une extraction régulière et satisfaisante de Subtiline :

N° essai	Milieu	Age des préle- vements	Nb b. Roux	Vol. par b. Roux	Poids des voiles humides	Poids par b. Roux	Extraction alcoolique		
							Volume	Titre par cm³	Activité par b. Roux
		heures		cm³	grs	grs	cm³	unités	unités
1	877	40	80	150	1730	21,6	4.100	60	3.075
2	"	45	20	150	495	24,75	1.200	60	3.600
3	"	45	20	150	500	25	1.120	60	3.360
4	"	43	20	150	500	25	1.200	90	5.400
5	"	40	20	150	515	25,75	1.280	60	3.850
6	"	43	150	150	3485	23,2	8.950	60	3.580
7	"	46	20	150	395	19,7	1.000	120	6.000
8	"	42	150	150	3880	25,8	10.100	60	4.040
9	"	45	20	150	460	23	1.000	60	3.000
10	"	43	20	150	530	26,5	1.330	60	4.000
11	"	45	311	150	7200	23,1	13.500	66	2.200

ETUDE DE DIVERSES VARIANTES DE LA FORMULE PRÉCÉDENTE :

Les variations que nous avons fait subir à cette formule initiale ont surtout porté sur ses constituants azotés. Nous avons principalement cherché à remplacer l'asparagine par d'autres éléments azotés :

D'autre part, il semblait naturel d'essayer d'introduire de la mélasse dans le milieu de culture, celle-ci contenant, outre une quantité de saccharose importante, capable de remplacer le saccharose pur, un taux non négligeable d'asparagine. Des résultats très intéressants et tout à fait en accord avec ceux publiés ultérieurement par LEWIS, STUBBS et col. (75-122) ont été obtenus dans ce sens.

a) *Remplacement de l'asparagine par une quantité équivalente en azote d'acide glutamique.*

2 grammes d'asparagine ont été remplacés par 4,6 grammes d'acide glutamique, portant la teneur totale du milieu à 6,6 gram-

mes d'acide glutamique. Nous avons obtenu sur ce milieu des résultats équivalents à ceux obtenus sur le milieu témoin :

N° essai	Milieu	Age des préle- vements	Nbre b. Roux	Vol. par b. Roux	Poids des voiles humides	Poids par b. Roux	Extraction alcoolique		
		heures		cm ³	grs	grs	Volume	Titre par cm ³	Activité par b. Roux
1	Témoin (877)	45	20	150	560	28	1300	60	3.900
	Essai	45	20	150	530	26,5	1400	60	4.200
2	Témoin (877)	45	20	150	500	25	1125	60	3.375
	Essai	45	20	150	520	26	1230	60	3.690

b) Remplacement de l'asparagine par de l'urée.

L'urée a été utilisée aux doses soit de 0,45, soit de 0,90 gramme par litre. Dans ces conditions, la production d'antibiotique est très satisfaisante; elle est du même ordre sur chacun de ces 2 milieux et sur le milieu témoin :

Milieux d'essai	Age des préle- vements	Nbre b. Roux	Vol. par b. Roux	Poids des voiles humides	Poids par b. Roux	Extraction alcoolique		
	heures		cm ³	grs	grs	Volume	Titre par cm ³	Activité par b. Roux
Témoin (877)	45	20	150	500	25	1120	60	3.360
Remplacement de 2 gr. d'aspa- ragine par 0,45 urée	45	20	150	550	27,2	1320	60	3.960
Remplacement de 2 gr. d'aspa- ragine par 0,90 urée	45	20	150	550	27,2	1315	60	3.945

Le milieu à 0,45 gr. d'urée (qui correspond à notre formule n° 891) nous a donné des résultats assez constants, et nous l'avons retenu pour effectuer un certain nombre de nos préparations de suivants :

Subtiline. Nous avons, dans ces conditions, obtenu les rendements

N ^o essai	Milieu	Age des pré- vements	Nbre b. Roux	Vol. par b. Roux	Poids des voiles humides	Poids par b. Roux	Extraction alcoolique		
		heures					Volume	Titre par cm ³	Activité par b. Roux
				cm ³	grs	grs	cm ³	unités	unités
1	891	42	152	150	3820	25,1	10.100	60	3.980
2	"	43	202	150	5100	34	13.100	60	3.900
3	"	45	310	150	7750	25	20.400	60	3.950
4	"	45	317	150	8070	25,4	21.100	30	2.000
5	"	42	311	150	7100	22,8	18.300	60	3.600
6	"	42	306	150	8975	29,3	23.500	30	2.300
7	"	41	313	150	8200	26,1	21.100	45	3.100
8	"	60	322	150	7200	22,3	17.600	100	5.450

c) *Suppression à la fois de l'asparagine et de l'acide glutamique, et remplacement soit par PO⁴H(NH⁴)², soit par PO⁴H(NH⁴)² + urée.*

Dans ce cas, les extractions alcooliques présentent des titres comparables à ceux provenant des milieux témoins. Mais les poids de *B.subtilis* récoltés sont inférieurs à ceux retirés de ces derniers milieux, ce qui diminue le chiffre de la production totale :

Milieux	Poids des voiles humides grs	Poids par b. Roux grs	Extraction alcoolique			
			Volume cm ³	Titre par cm ³ unités	Activité par b. Roux unités	
877 — Témoin	500	25	1200	90	5.400	
Remplacement de:	par { A. 11 gr. PO ₄ H(NH ₄) ₂ B. 11 gr. PO ₄ H(NH ₄) ₂ + 0,45 urée C. 14 gr. PO ₄ H(NH ₄) ₂	380	19	810	45	1.820
PO ₄ H(NH ₄) ₂ 8		410	20,5	1010	60	3.030
Asparagine 2						
Ac. glutamique 2		320	16	750	90	3.375

(L'essai de chaque milieu a été effectué sur 20 boîtes de Roux contenant chacune 150 cm³ de milieu.

Les résultats ci-dessus ont été établis au bout de 43 heures de culture à 37°).

d) *Milieux à la mélasse.*

La mélasse utilisée, à quantité égale de saccharose, contenait un taux de N aminé sensiblement égal à celui du milieu témoin n° 877, et un chiffre de N total un peu supérieur. Utilisée comme unique source d'azote elle n'a permis qu'une croissance insuffisante du *B.subtilis*, mais par addition de PO⁴H(NH⁴)² au milieu, celle-ci s'est trouvée nettement accrue par rapport à celle obtenue sur le milieu témoin, ce qui a permis un gain d'unités sur le total

de la production, les titres des jus d'extraction étant au moins égaux à ceux des jus témoins.

Une étude sur la variation de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)^2$ nous a montré que la production était améliorée par addition au milieu de 8 grammes par litre, le rendement étant sensiblement égal à celui obtenu dans ces conditions sur un milieu à 12 grammes par litre, et se montrant inférieur sur un milieu à 16 grammes par litre :

Milieux	Poids des voiles humides grs	Poids par b. Roux grs	Extraction alcoolique			
			Volume cm ³	Titre par cm ³ unités	Activité par b. Roux unités	
877 — Témoin	530	26,5	1.370	60	4.110	
Remplacement de Saccharose PO ₄ H(NH ₄) ₂ Asparagine Acide glutamique par :	A. 200 gr. mélasse + 2 PO ₄ H(NH ₄) ₂	686	34,3	1.580	30	2.370
	B. 200 gr. mélasse + 4 PO ₄ H(NH ₄) ₂	675	33,7	1.710	60	5.130
	C. 200 gr. mélasse + 8 PO ₄ H(NH ₄) ₂	709	35,4	1.560	120	9.360
	D. 200 gr. mélasse + 12 PO ₄ H(NH ₄) ₂	707	35,3	1.590	120	9.540
	E. 200 gr. mélasse + 16 PO ₄ H(NH ₄) ₂	684	34,2	1.410	60	4.230

(Chaque essai effectué sur 20 b. Roux contenant chacune 150 cm³ de milieu. Résultats établis au bout de 45 heures à 37°).

La formule à 8 grammes par litre de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)^2$ a été retenue et constitue notre formule n° 903, sur laquelle nous avons également basé un certain nombre de préparations de Subtiline :

N° essai	Milieu	Age des prélè- vements heures	Nb're b. Roux	Vol. par b. Roux cm ³	Poids des voiles humides grs	Poids par b. Roux grs	Extraction alcoolique		
							Volume cm ³	Titre par cm ³ unités	Activité par b. Roux unités
1	903	45	20	150	650	32,5	1280	120	7.680
2	"	41	309	150	9670	31,3	22100	120	8.580
3	"	45	20	150	709	35,4	1560	120	9.360
4	"	45	20	150	913	45,6	1660	90	7.470

L'ensemble de toutes nos cultures en surface sur les milieux 877,891 et 903, constitue le départ du lot de Subtiline purifiée Dp 1759, dont nous avons étudié l'activité plus loin.

EXTRACTION DE LA SUBTILINE

Le produit actif dont nous avons étudié l'élaboration, et dont l'examen constitue la seconde partie de notre travail, a été extrait des cultures de la souche de *B.subtilis* ATCC 6633 en suivant le principe de la technique exposée par DIMICK et col. (23) :

le voile humide séparé est additionné de environ 2 parties d'alcool éthylique à 95 %, ce qui conduit à une concentration en alcool de 65 à 70 %. Après agitation, on laisse en contact durant une nuit à la glacière avant de séparer la solution alcoolique par décantation et filtration.

Concentration de l'extrait alcoolique.

L'extrait alcoolique est additionné de 1 % d'acide acétique cristallisable, puis concentré sous vide à environ 1/5 de son volume. On laisse à nouveau reposer une nuit en glacière, à 4°, puis le précipité formé est séparé par centrifugation et lavé 2 fois avec 2 volumes d'eau. Le précipité lavé est alors séché par lyophilisation; réduit en poudre brune finement divisée, il constitue la fraction A.

Extraction de la fraction A par l'alcool éthylique à 95 %.

La fraction A subit une première purification basée sur le fait que la Subtiline est insoluble dans l'alcool éthylique à 95 %, contrairement à une partie importante des solides constituant cette fraction.

Quatre extractions successives à raison de 15 cm³ d'alcool par gramme de produit solide laissent un résidu qui, séparé par centrifugation et lyophilisé, constitue la fraction B.

Extraction de la fraction B par l'alcool éthylique à 85 % contenant 1 % d'acide acétique et 1 % de ClNa.

En solution alcoolique acidifiée, la présence de ClNa a un effet marqué sur la solubilité des impuretés et de la substance active. Dans l'alcool à 85 % contenant 1 % d'acide acétique, les solides de la fraction B sont toujours solubles à un taux appréciable, mais il n'y a pas de différence de solubilité entre la fraction gommeuse et l'antibiotique.

Quand on ajoute 1 % de ClNa, il se produit un recul de solubilité à plus de 70 %, tandis que simultanément la solubilité de la Subtiline est réduite de 2 fois ou plus.

Pratiquement on extrait 4 fois la fraction B à la température du laboratoire, avec 100 cm³ du mélange solvant pour 5 grammes de solide. La substance insoluble, recueillie par centrifugation, constitue la fraction C.

Fractionnement avec un acétate.

La fraction C est dissoute par agitation dans de l'acide acétique aqueux 0,08M, à raison de 35 cm³ par gramme de substance. Puis on ajoute OHK N en agitant, jusqu'à ce que le pH atteigne 4,6 à 4,7. A ce moment il se précipite une substance brune riche en produit actif; cette substance, séparée par centrifugation, est redissoute en solution acétique et traitée comme précédemment. Cette opération est effectuée 5 fois. On sépare alors le résidu gommeux insoluble, et on recueille le total des liquides d'extraction, que l'on concentre à 1/4 de son volume sous vide. Débarrassé de ses sels et lyophilisé, ce concentré constitue la fraction D, produit final, qui se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble à 10-20 % dans l'eau distillée.

Ce procédé s'applique uniquement aux cultures en surface. Dans le cas des cultures immergées, le produit actif est directement extrait par action du butanol sur la culture totale; diverses modifications dans la suite de la technique ont été adoptées par les chercheurs du WRRL (22-36-78).

DOSAGE DE LA SUBTILINE

Les procédés que nous avons employés pour apprécier le titre de la Subtiline se rattachent aux méthodes générales de dosage des antibiotiques. Dans toutes ces méthodes, l'activité antimicrobienne est estimée vis-à-vis de souches sensibles données et dans des conditions d'essai déterminées.

On distingue : a) les méthodes par dilution,
b) les méthodes par diffusion.

La Subtiline, diffusant dans la gélose, est susceptible d'être dosée par des procédés se rattachant à chacun de ces groupes.

Trois techniques ont été étudiées au cours de notre travail, deux se rattachant aux méthodes par dilution et une aux méthodes par diffusion :

1) *Technique turbidimétrique*, mise au point et publiée par LEWIS, HUMPHREYS et col. (76). L'organisme sensible est une souche de *Staphylocoque*.

2) *Méthode basée sur la bactériostase du Bacillus Bulgaricus*, qui en se développant produit une acidité capable de provoquer la coagulation du lait. Cette méthode a été décrite par SANCHEZ et LAMENSANS pour le dosage de la Pénicilline et de la Streptomycine (116-117).

3) *Méthode par diffusion*. — Nous avons suivi la technique générale, en utilisant un milieu nutritif tamponné, et, comme germe sensible, le *Micrococcus citreus* ATCC 8411.

1. TECHNIQUE TURBIDIMÉTRIQUE (76).

Cette méthode est basée sur la méthode décrite par Mc Mahan pour le dosage de la Pénicilline (79). Elle a été mise au point par les chercheurs américains du Western Regional Research Laboratory et du Northern Regional Research Laboratory.

Cultures et Inoculum. — La souche de *Staphylococcus aureus* FDA 209 P est conservée en glacière sur milieu II gélosé de SCHMIDT et MOYER (118) (voir formule ci-dessous). Un repiquage, effectué chaque semaine, est maintenu en glacière après développement à 37° et sert à la préparation de la souche du jour. Celle-ci consiste en une culture d'une nuit à 37° d'un ensemencement de la souche hebdomadaire sur milieu II non gélosé; elle est introduite à raison de 2 % dans les dilutions de dosage de la Subtiline en bouillon nutritif.

Milieu de dosage. — La formule du milieu utilisé pour le dosage est celle du milieu II de SCHMIDT et MOYER :

Peptone bactériologique (UCLAF)	5 gr.
Extrait de levure (DIFCO)	1,5 gr.
Extrait de viande (DIFCO)	1,5 gr.
Glucose	3,5 gr.
PO ⁴ H ² K	4 gr.
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³
pH ajusté à 6,8 à l'aide de OHK	

On prépare ce milieu 1 fois 1/2 plus concentré qu'il doit être utilisé dans les cultures de dosage, afin de se trouver à la concentration désirée après addition des dilutions antibiotiques.

Etalon de Subtiline. — Ainsi que nous l'avons déjà dit, nous avons ici adopté comme unité 1/140^e de milligramme de la prépa-

ration de Subtiline constituant le lot Dp 1759. Cet étalon est conservé en glacière.

Echantillons à doser. — Les produits secs et les solutions actives, alcooliques ou non, sont amenés à la concentration voulue par dilution dans de l'eau acidifiée à pH 2,5 par addition de ClH.

Technique. — Dans 3 tubes à essai, on introduit respectivement 1,67 - 3,94 - 5 cm³ de la dilution convenable en eau acidifiée du produit à doser. On complète à 5 cm³ avec de l'eau acidifiée. Chaque tube est préparé en triple exemplaire. On préparera également des tubes témoins ne contenant pas de Subtiline, et d'autres contenant une dose suffisante de Subtiline pour inhiber la croissance du Staphylocoque.

Ensuite, on ajoute dans chaque tube 10 cm³ de bouillon nutritif ensemencé à raison de 2 % avec une culture d'une nuit de Staphylocoque. Puis on place au bain-marie à 37° et laisse incubé 4 heures sans agiter.

Lorsque les tubes-témoins de culture de Staphylocoque sont bien développés, on stérilise à l'autoclave.

Le degré turbidimétrique exprimant le développement du Staphylocoque dans chaque tube est déterminé le lendemain par photométrie; le chiffre qui le traduit à l'électrophotomètre est proportionnel à la densité optique des tubes.

Résultats. — On détermine pour chaque série de tubes le pourcentage de turbidité par rapport à la turbidité développée parallèlement par les tubes-témoins sans Subtiline correspondants (un tube témoin accompagne chaque série de 3 tubes). On calcule ensuite les opacités moyennes développées dans les tubes correspondants des 3 séries parallèles préparées pour le dosage de chaque produit.

Puis les valeurs obtenues sont utilisées pour la construction d'une courbe : on porte en abscisses les volumes de solution antibiotique introduits dans les tubes, et en ordonnées les opacités correspondantes développées au cours du dosage.

La courbe tracée pour un échantillon permet, en se référant à la courbe tracée pour une solution étalon, de déduire le titre de celui-ci.

2. MÉTHODE BASÉE SUR LA BACTÉRIOSTASE DU LACTOBACILLUS BULGARICUS.

Cette méthode de dosage a été décrite par SANCHEZ et LAMENSANS (116-117) pour le dosage de la Pénicilline et de la Streptomycine. Nous avons pu appliquer son principe au dosage de la Subtiline.

Cet antibiotique est en effet remarquablement actif sur le *Lactobacillus Bulgaricus*, puisque 0,01 à 0,02 unité par cm³ suffisent pour empêcher la coagulation à 45° du laitensemencé avec ce bacille lactique. Cette coagulation peut être obtenue en 3 heures environ; ceci représente donc le délai nécessaire pour déterminer la plus petite dose capable d'entraver la croissance du bacille, et ce temps relativement court constitue un des avantages du procédé.

Organisme d'essai. — *Lactobacillus Bulgaricus* B B Y, souche de SANCHEZ et LAMENSANS*. Elle est entretenue par repiquages fréquents sur lait entier.

La souche servant d'inoculum est obtenue par repiquage d'une culture antérieure dans du lait écrémé non dilué, et incubation à l'étuve jusqu'à coagulation. Une heure environ après la coagulation, on sort de l'étuve et maintient en glacière jusqu'au moment du dosage. Onensemence à raison de 2 cm³ de culture pour 100 cm³ de lait dilué au 1/2.

Milieu du dosage. — On a utilisé du lait écrémé obtenu par dissolution de 100 gr. de lait en poudre, marque Lactasol, dans 1 litre d'eau distillée.

Ce lait est utilisé non dilué pour la culture des souches, dilué au 1/2 pour les cultures de dosage. Il est stérilisé par passage de 1/4 d'heure à 110°-115°.

Echantillons à doser. — Les produits secs et les solutions actives sont amenés à la concentration voulue (de l'ordre de 0,01 à 0,02 unité par cm³) par dilution en eau distillée.

Technique. — On prépare la gamme de dilutions suivante, présentant un écart d'environ 20 % (17 à 21 % entre chaque tube et celui qui le précède :

	(Volumes indiqués en cm ³)									Té- moin
Solution de Subtiline conve- nablement diluée	0,25	0,30	0,35	0,42	0,50	0,60	0,70	0,85	1	0
Eau distillée	0,75	0,70	0,65	0,58	0,50	0,40	0,30	0,15	0	1
Écart entre chaque tube et le tube qui le précède	20 %	17 %	20 %	19 %	20 %	17 %	21 %	17 %		

* Cette souche nous a été remise par M. Sanchez, de l'Institut Pasteur, que nous remercions très vivement de l'aimable accueil qu'il a bien voulu nous réserver.

Après incubation suffisante au bain-marie à 45° (3 heures en général), on détermine dans chaque gamme le tube qui contient la quantité minima de Subtiline assurant la bactériostase de *Lactobacillus Bulgaricus*, c'est-à-dire le dernier tube où l'on n'observe pas de coagulation.

Calculs. — Une simple règle de trois nous permet de déduire le titre Tx de la solution inconnue.

Soient respectivement Ve et Vx les volumes minima de solution-étalon de titre Te et de solution inconnue de titre Tx nécessaires pour assurer la bactériostase.

$$\text{On aura : Tx} = \frac{\text{Ve}}{\text{Vx}} \times \text{Te}$$

Résultats. — Les résultats obtenus sont assez constants. Nous donnons à titre indicatif les titres déterminés 5 jours de suite pour 5 produits différents (chaque titre calculé résulte de la moyenne des lectures de 2 gammes; la gamme-étalon est effectuée en triple exemplaire).

Solutions dosées	1 ^{er} jour	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour	5 ^e jour	Moyenne	Écarts maxima par rapport à la moyenne
B ₀	66	63	56	55	61	60	+ 10 % — 8 %
B ₁	53	46	45	53	49	49	+ 8 % — 8 %
B ₂	58	42	54	40	56	50	+ 16 % — 20 %
B ₃	49	46	40	49	51	47	+ 8 % — 15 %
B ₄	37	29	28	31	36	32	+ 21 % — 12 %

Conclusions. — L'avantage de cette méthode consiste en sa rapidité et sa sensibilité. Comme le montre le tableau ci-dessus, la reproductibilité des résultats obtenus est satisfaisante. Sa précision est du même ordre que celle que l'on peut attendre des méthodes par dilution.

Un des gros inconvénients que nous avons rencontré est l'instabilité de la souche microbienne qui, pour de très petites différences de temps et de température de développement, présente des variations allant facilement du simple au triple dans la sensibilité à la Subtiline. On risque ainsi très facilement d'avoir une zone de virage du produit inconnu en dehors de la gamme de dilutions. On peut évidemment y remédier en augmentant l'étendue de la gamme utilisée pour la dilution des produits inconnus, mais il faut alors effectuer une manipulation supplémentaire importante.

3. MÉTHODE PAR DIFFUSION.

La propriété de diffuser dans la gélose, que possède la Subtiline à un degré appréciable, a permis de lui appliquer des méthodes de dosage par diffusion.

Dans cet ordre d'idées, HOUSEWRIGHT, HENRY et col. (56) ont établi une technique de dosage basée sur la diffusion de la Subtiline sur des plaques de gélose nutritive ensemencées avec une souche de *Bacillus cereus*.

La méthode que nous avons utilisée est basée sur la diffusion de la Subtiline dans une gélose nutritive ensemencée avec la souche de *Micrococcus citreus* ATCC 8411.

Pour mettre au point cette technique, nous avons appliqué les principes sur lesquels reposent toutes les méthodes de dosage par diffusion des antibiotiques : par un artifice quelconque (anneaux de verre ou métalliques, rondelles de papier...) les solutions de la substance antibiotique à doser sont mises au contact d'une gélose nutritive ensemencée avec un germe sensible à cette substance. L'ensemble est mis en incubation à 37°. Le produit actif diffuse dans la gélose, déterminant autour de la surface de contact une zone où la concentration en substance active est suffisante pour inhiber la croissance du microbe. D'après les lois de la diffusion, celle-ci est proportionnelle au titre de la solution; le diamètre des auréoles d'inhibition est donc fonction de ce titre, qui peut être déterminé d'une manière satisfaisante lorsqu'on opère dans des conditions rigoureusement définies.

Organisme d'essai. — L'examen, par l'agar-streak method (128) dont nous exposons plus loin la technique, d'un certain nombre de germes en notre possession, nous a révélé parmi ceux-ci 3 micro-organismes suffisamment sensibles à la Subtiline pour être utilisés dans ce cas :

— *Micrococcus citreus* ATCC 8411,

— *Lactobacillus casei* ATCC 7409,

— *B. mesentericus ruber* (souche de la Faculté de Pharmacie).

Lorsque ces 3 germes sont respectivement ensemencés à dose convenable sur des plaques gélosées de milieu nutritif à la surface desquelles des cylindres de verre ont été fixés comme il est dit plus loin, et remplis de solutions de Subtiline de titre voulu, on voit autour de ces cylindres, après incubation à 37° durant une nuit, des auréoles d'inhibition contrastant avec le reste de la gélose, où les germes se sont abondamment développés; ces auréoles d'inhibition sont suffisamment grandes et nettes pour que le diamètre en puisse être mesuré d'une manière correcte. Avec *Micrococcus*

citreus, le même résultat est atteint après incubation soit à 27°, soit à 30°; c'est ce germe que nous avons choisi comme organisme pour nos dosages.

La souche de *Micrococcus citreus* ATCC 8444 est conservée sur des géloses inclinées de bouillon peptoné salé. Des repiquages identiques sont préparés chaque semaine et conservés en glacière après développement 24 heures à 37°; quotidiennement, on prépare, à partir de ces souches de semaine, une gélose inclinée qui, après 24 heures de culture à 37°, constitue l'inoculum servant à ensemercer le milieu gélosé utilisé pour le dosage.

Principe du dosage. — Dans des boîtes de Pétri stériles, on coule d'abord une couche de base de gélose nutritive; on ajoute ensuite sur cette dernière une couche mince de gélose nutritive ensemencée avec le *Micrococcus citreus*. Les solutions de Subtiline diluées convenablement sont introduites dans des petits cylindres fixés à la surface de la gélose. On met en incubation à 30°. La diffusion se fait proportionnellement au titre des solutions, en même temps que se développe le germe sensible. Du diamètre des auréoles d'inhibition déterminées, on déduit le titre des solutions inconnues en se référant à un étalon.

Milieu et préparation des boîtes. — Le milieu utilisé correspond à la formule suivante :

Extrait de viande DIFCO	1,5 gr.
Extrait de levure DIFCO	3 gr.
Péptone bactériologique UCLAF..	6 gr.
Glucose anhydre pur	1 gr.
PO ⁴ HNa ² .12OH ²	7,15 gr.
PO ⁴ H ² K	4,1 gr.
Gélose	20 gr.
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³
pH = 7	

On introduit une couche de base de 17 cm³ de ce milieu dans les boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Après durcissement de la gélose, on ajoute une couche de surface de 3,5 cm³ du même milieu ensemencé et maintenu à la température de 48-50°; ce milieu est ensemencé à raison de 2 % d'une suspension dans 10 cm³ d'eau distillée de la culture sur une gélose inclinée de la souche du jour.

Aussitôt préparées, les boîtes sont gardées en glacière jusqu'à utilisation.

Sur la surface gélosée, on fixe alors les cylindres de verre où doivent être introduites les solutions actives que l'on veut doser. Ces cylindres sont en verre Pyrex : ils mesurent 8 mm de diamètre

extérieur, 6 mm de diamètre intérieur, et 8 mm de hauteur. Ils sont chauffés sur une plaque électrique; de là, avec une pince, on les place sur la surface gélosée : la chaleur fond la gélose, qui se fixe alors sur l'anneau de verre en formant une cupule où sera introduite la solution à doser.

Préparation des échantillons à doser.

On dilue d'abord la solution à doser en eau distillée jusqu'à un titre prévu aussi voisin que possible de 10 unités. Puis on fait à ce moment une dilution 1/2 avec une solution-tampon $\text{PO}_4\text{H}^2\text{K}$ - PO_4HNa_2 de concentration 0,2 M, ce qui assure une concentration 0,1 M de phosphates et un titre voisin de 5 unités par cm^3 dans les dilutions finales qui seront introduites dans les anneaux.

Dosage. — Sur chaque boîte de dosage sont placés 6 anneaux; la dilution du produit inconnu est introduite dans 3 anneaux, et dans les 3 autres on met une solution étalon de Subtiline titrant 5 unités par cm^3 , en alternant les anneaux de solution inconnue et les anneaux de solution étalon. Pour chaque produit, on utilise 4 à 6 boîtes de Pétri.

D'autre part on prépare des boîtes destinées à permettre de construire une courbe-étalon. Dans les anneaux de celles-ci sont introduites des solutions titrant : 10 - 5 - 2,5 - 1,25 unités par cm^3 .

Après une nuit d'incubation à 30°, on mesure le diamètre des auréoles d'inhibition. On construit alors une courbe-étalon traduisant les différences de diamètres des auréoles d'inhibition qui correspondent aux différences de titres des solutions de Subtiline. D'autre part on calcule la moyenne des diamètres des auréoles d'inhibition déterminées par la solution inconnue, ainsi que celle des diamètres des auréoles d'inhibition déterminées sur les mêmes boîtes par la solution étalon. La différence de grandeur de ces 2 valeurs correspond à une différence de titré que l'on peut lire sur la courbe-étalon.

Résultats. — Ce procédé permet de réaliser d'une manière assez simple le dosage de produits arrivés à un certain stade de purification. Il donne alors des résultats constants, et du même ordre de précision que tous les procédés analogues par diffusion. Toutefois, il n'est pas applicable avec succès au dosage des extractions alcooliques des jus de culture, car dans ceux-ci la présence de nombreuses impuretés provoque au contact des phosphates et de la gélose nutritive une précipitation qui gêne la diffusion. Il rend cependant de grands services dans le dosage de solutions de produits purifiés; nous l'avons utilisé pour de nombreux essais se rapportant au produit pur, tels que les essais de la stabilité de la Subtiline.

II

QUELQUES PROPRIÉTÉS DE LA SUBTILINE ISOLÉE

Stabilité de solutions de subtiline à 100°

La stabilité de la Subtiline à 100° a été examinée d'une part en eau distillée, et d'autre part en solutions aqueuses tamponnées à divers pH.

Technique d'étude. — La solution examinée est introduite par quantités de 5 cm³ dans des tubes à essai qui sont plongés simultanément dans un bain-marie bouillant. Au bout des temps voulus, un tube est retiré et immédiatement refroidi dans l'eau glacée. Les dosages sont effectués par la méthode par diffusion.

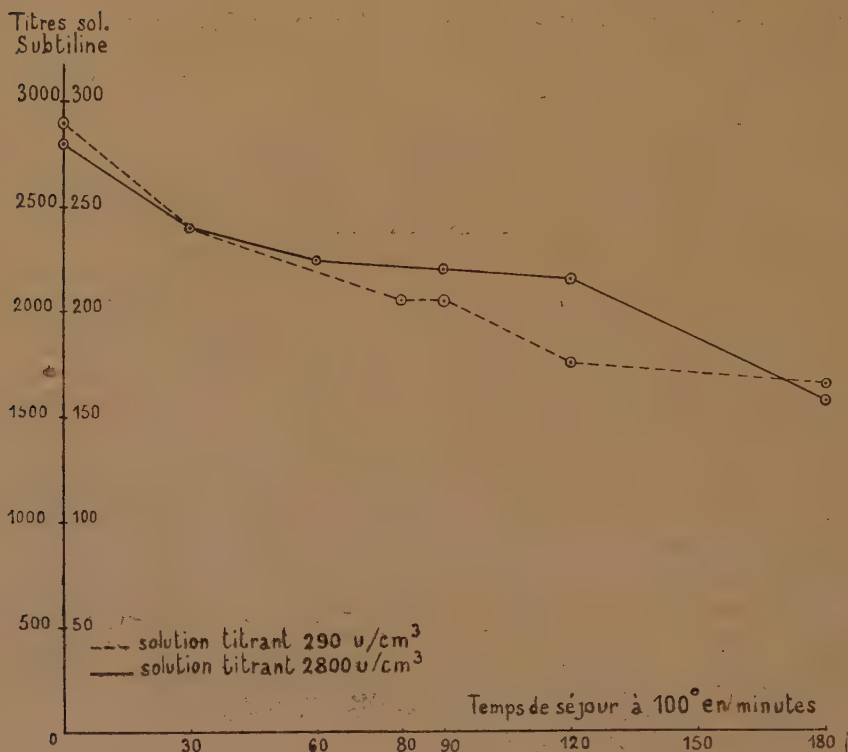
A) STABILITÉ EN EAU DISTILLÉE.

Nous avons essayé une solution titrant 290 unités par cm³ et une autre titrant 2.800 unités par cm³. Le pH de ces solutions est de 5 environ.

L'évolution du titre des 2 solutions est montré dans le tableau suivant :

Temps de séjour à 100°	Évolution du titre de la solution à 290 u/cm ³	Évolution du titre de la solution à 2.800 u/cm ³
minutes	unités par cm ³	unités par cm ³
0	290	2.800
30	240	2.400
60		2.250
80	205	
90	205	2.200
120	175	2.150
180	165	1.150

Stabilité à 100° de deux solutions aqueuses de Subtiline



A la précision des dosages près, nous observons une évolution parallèle des titres des 2 solutions. La Subtiline se révèle relativement stable en solution aqueuse à 100°; au bout de 2 heures, elle ne perd que 30 à 40 % de son titre dans ces conditions.

B) STABILITÉ EN SOLUTIONS TAMPONNÉES A DIVERS PH.

La stabilité en solution aqueuse dépend en grande partie du pH. Nous avons répété l'essai précédent sur des solutions titrant 50 unités par cm^3 , tamponnées par un mélange de phosphates $\text{PO}^4\text{HNa}^2\text{-PO}^4\text{H}^2\text{K}$ M/10. Les pH étudiés ont été : 6, 7, 8.

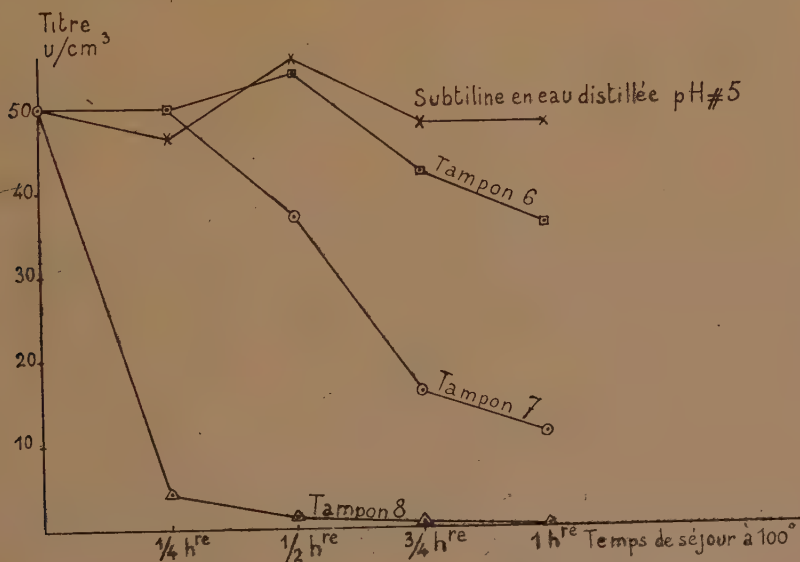
Nous avons également effectué le même essai avec une solution aqueuse titrant 50 unités par cm^3 , dont le pH est environ 5.

L'évolution suivante du titre des solutions a pu être établie, les dosages étant toujours effectués par la méthode par diffusion :

Solutions essayées	Titres déterminés au bout de :				
	0 heure (Témoin)	1/4 heure	1/2 heure	3/4 heure	1 heure
50 u/cm ³ en eau distillée pH = 5	50	46	56	48	48
50 u/cm ³ en tampon 6	50	50	54	42	36
50 u/cm ³ en tampon 7	50	50	37	16	11
50 u/cm ³ en tampon 8	50	4,2	1,3	0,9	0,1

Nous voyons que l'instabilité augmente avec le pH de la solution.

Stabilité à 100° de solutions de subtiline tamponnées à divers pH



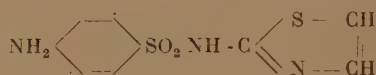
Action de l'acide para-amino-benzoïque sur la subtiline

Nous avons cherché si l'acide para-amino-benzoïque, inhibiteur des sulfamides, exerçait également une action antagoniste envers la Subtiline. Dans cet essai, nous avons utilisé le para-amino-benzène-sulfonamidothiazol (Sulfathiazol) comme témoin du pouvoir destructeur de la solution d'acide para-amino-benzoïque utilisée.

Produits essayés.

Subtiline Dp 1759, titrant 140 unités par mgr.

Sulfathiazol.



Organisme d'essai.

Pneumocoque, souche Til. On se sert d'une dilution d'une culture de 24 heures sur milieu T.

Milieu utilisé.

Formule T :	Peptone bactériologique UCLAF	40 gr.
	Glucose anhydre pur	2 gr.
	ClNa	5 gr.
	Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³
	pH =	7,5

Cette formule présente l'inconvénient, dans le cas présent, de contenir une quantité importante de peptone qui, à un faible degré, possède également un pouvoir antisulfamide. Mais nous pouvons néanmoins en faire usage, car nous effectuons ici un essai de caractère qualitatif plutôt que quantitatif.

Principe et Technique.

Des concentrations de Subtiline, titrant respectivement 10 - 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001 unité par cm³, ont été préparées en milieu T. D'autre part, des dilutions 1/10 - 1/100 - 1/1.000 - 1/10.000 d'une solution de Sulfathiazol à 1 % ont été préparées dans le même milieu.

Deux séries de dilutions de chaque produit ont servi de témoins, deux autres ont été additionnées de 5 γ d'ac. para-amino-benzoïque pour 5 cm³.

Chaque tube a étéensemencé par introduction de 1 goutte d'une culture de 24 heures de Pneumocoque, sur milieu T, diluée à 1/10.

Après 2 jours d'incubation à 37°, nous avons obtenu le tableau de résultats suivants :

	Dilutions				
	1/10	1/100	1/1.000	1/10.000	1/100.000
Sol. sulfathiazol 1 %	0 0	0 0	0 0	++ ++	
Sol. sulfathiazol 1 % + 1 γ ac. p. amino benzoïque par cm ³	0 +	++ ++	++ ++	++ ++	
Subtiline 100 unités par cm ³	0 0	0 0	+ +	++ ++	++ ++
Subtiline 100 u/cm ³ + 1 γ ac. p. amino benzoïque par cm ³	0 0	0 0	++ +	++ ++	++ ++
Témoins : Bouillon T		++			
Bouillon T + 1 γ/cm ³ ac. p. amino. benzoïque		++			

0 = développement microbien nul,
 + = développement microbien faible,
 ++ = développement microbien abondant.

Contrairement aux résultats obtenus dans le cas de Sulfathiazol, la présence de 1 γ d'acide para-amino-benzoïque par cm³ n'a donc pas influé sur l'inhibition du Pneumocoque par la Subtiline dans les conditions d'essai.

Action de la cystéine sur la subtiline

Des solutions de Subtiline en tampon 7, titrant 50 unités par cm³, ont été additionnées de cystéine à diverses concentrations. Après contact de 3 heures à 37°, on a dosé l'activité restante.

Technique. — On prépare des solutions en tampon-phosphates pH 7,0 0,1 M, titrant 5 unités de Subtiline par cm³, et additionnées d'une solution de chlorhydrate de cystéine fraîchement préparée, aux teneurs finales de 10 mgr - 1 mgr - 0,1 mgr - 0,01 mgr par cm³. Ces solutions sont réparties en tubes à essai par 5 cm³.

Après un séjour à 37° durant 3 heures, chacune est dosée par la méthode des dilutions : après dilution en milieu nutritif, on ensemence à raison de 1 goutte par tube d'une culture de Staphylocoque doré de 24 heures, diluée à 1/50.

Résultats. — Après 16 heures d'incubation à 37°, le tableau de l'essai se traduit ainsi (nous donnons un essai-type, en accord avec les autres essais analogues qui ont été effectués) :

	Dilutions en milieu nutritif											
	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/8	1/10	1/12	1/14	1/16	1/18	1/20
Solution de Subtiline 5 u/cm ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Solution de Subtiline 5 u/cm ³ additionnée de 0,01 mgr/cm ³ de cystéine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Solution de Subtiline 5 u/cm ³ additionnée de 0,1 mgr/cm ³ de cystéine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Solution de Subtiline 5 u/cm ³ additionnée de 1 mgr/cm ³ de cystéine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
Solution de Subtiline 5 u/cm ³ additionnée de 10 mgr/cm ³ de cystéine	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Témoin cystéine (10 mgr/cm ³ de chl. de cystéine) .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

On voit que dans une certaine mesure la cystéine est capable d'exercer une action destructrice ou interférante vis-à-vis de la Subtiline.

Action des ferments protéolytiques sur la Subtiline

SALLE et JANN (144) d'une part, STANSLY et ANANENKO (121) d'autre part, ont constaté l'effet destructeur des ferments protéolytiques sur la Subtiline de Jansen. Les essais qui suivent établissent la sensibilité de notre lot de Subtiline à la pepsine, la pancréatine et la papaïne.

A) ACTION DE LA PEPSINE.

0,10 gr. de pepsine Vaillant (titre 200) ont été ajoutés à 5 cm³ d'une solution de Subtiline en eau distillée titrant 50 unités par cm³, ajustée à pH 3 à l'aide de ClH. Un témoin Subtiline sans pepsine et un témoin pepsine ont également été préparés et soumis

au même traitement que le tube d'essai. Après un séjour de 6 heures à 45-50°, suivi d'un passage à 100° pendant 10 minutes pour assurer la destruction de l'enzyme, le dosage de l'activité antibiotique restant a été effectué par la méthode des dilutions (avec gamme de dilutions logarithmique de raison 2 — milieu nutritif :

Peptone bactériologique UCLAF 20 gr.

Glucose anhydre pur 2 gr.

ClNa 5 gr.

Eau distillée q.s.p. 1.000 cm³

tamponné à pH 6,5 par un mélange PO⁴H²K-PO⁴HNa²

Les résultats suivants ont été obtenus après incubation à 37° pendant 18 heures :

	Dilutions							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Sol. Subtiline additionnée de pepsine	+	+	+	+	+	+	+	+
Témoin Subtiline sans pepsine	0	0	0	0	0	0	0	+
Témoin pepsine (pepsine en eau dist. acidifiée à pH 3	+	+	+	+	+	+	+	+

La Subtiline a donc été détruite sous l'action de la pepsine, dans les conditions où nous avons opéré.

B) ACTION DE LA PANCRÉATINE.

Nous avons additionné de pancréatine (Vaillant, titre 150) une solution de Subtiline en tampon-phosphate pH 7, titrant 50 unités par cm³, dans les proportions de 0,10 de pancréatine pour 5 cm³ de solution. Les témoins suivants ont également été préparés : témoin Subtiline, constitué par la solution active titrant 50 unités par cm³; témoin pancréatine, constitué par l'addition de 0,10 de pancréatine à 5 cm³ de solution-tampon. Ces 2 témoins subissent au cours de la manipulation les mêmes traitements que les tubes d'essai.

Après digestion 1 heure à 45° et ébullition de 10 minutes assurant la destruction de l'enzyme, l'activité antibiotique restant a été appréciée par la méthode des dilutions (gamme de dilutions logarithmique de raison 2 — même milieu nutritif que précédemment, non tamponné, mais dont le pH est ajusté à 6,5).

Après incubation 18 heures à 37°, nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau suivant :

	Dilutions						
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Sol. Subtiline additionnée de pancréatine	+	+	+	+	+	+	+
Témoin Subtiline sans pancréatine	+	0	0	0	0	+	+
Témoin pancréatine (pancréatine en tampon pH 7)	+	+	+	+	+	+	+

Nous pouvons donc conclure à la destruction de la Subtiline par la pancréatine dans les conditions d'essai.

C) ACTION DE LA PAPAÏNE.

Nous avons suivi une technique analogue à la précédente pour mettre en évidence la sensibilité de la Subtiline à l'action destructrice de la papaïne.

0,10 gr. de papaïne ont été ajoutés à 5 cm³ d'une solution de Subtiline en tampon-phosphate pH 7, titrant 50 unités par cm³. Des témoins de l'activité antibiotique et de l'action du ferment sur la pousse microbienne ont aussi été préparés. Ici, nous avons effectué la digestion pendant 1 heure à 65°. Puis après 10 minutes d'ébullition nous avons dosé l'activité restante par la méthode des dilutions; les résultats se traduisent ainsi après 18 heures d'incubation à 37° :

	Dilutions						
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Sol. Subtiline additionnée de papaïne	0	+	+	+	+	+	+
Témoin Subtiline sans papaïne ..	0	0	0	+	+	+	+
Témoin papaïne (papaïne en tampon pH 7)	+	+	+	+	+	+	+

La papaïne a donc également une action destructrice sur la Subtiline, dans les conditions d'essai ci-dessus.

Ces faits sont en accord avec les constatations de SALLE et JANN (114) et de STANSLY et ANANENKO (121) concernant l'action de la pepsine, la trypsine, la pancréatine et l'érepsine sur la Subtiline de Jansen; ils tendent à prouver la nature polypeptidique de la Subtiline.

Action de la pénicillinase sur la Subtiline

Nous avons pu mettre en évidence l'action négative de la pénicillinase sur la Subtiline. Cet essai a été effectué comparativement avec une quantité de pénicilline présentant une activité du même ordre de grandeur sur Staphylocoque que la Subtiline utilisée.

Nous avons donc, d'une part, fait agir dans les mêmes conditions une même quantité de pénicillinase sur des quantités de Subtiline et de Pénicilline assurant à un degré identique l'inhibition du Staphylocoque au cours de 24 heures, et d'autre part avons vérifié l'identité de l'action antistaphylococcique, au cours de ce temps, des quantités des produits actifs utilisés dans cet essai.

A) ACTIVITÉ DE LA PÉNICILLINASE SUR LA SUBTILINE ET LA PÉNICILLINE.

Organisme d'essai. — *Staphylococcus aureus*, souche FDA 209 P

Technique. — A 1 cm³ de solution-tampon PO⁴H²K-PO⁴HNa² pH 7, concentration 0,05 M, additionné de 1 goutte de Pénicillinase de l'Institut Pasteur (diluée au 1/20°), on ajoute 1 cm³ soit d'une solution de Subtiline titrant 100 unités par cm³, soit d'une solution de Pénicilline G titrant 5 unités par cm³. Des témoins sont préparés sans Pénicilline.

Après un séjour de 1 heure au bain-marie à 37°, chaque tube est additionné de 4 cm³ de milieu II de SCHMIDT et MOYER (118) tamponné à pH 7, concentré 1 fois 1/2; après ensemencement avec 1 goutte de culture de 24 heures, diluée à 1/50, de la souche de Staphylocoque citée plus haut, l'ensemble est remis en incubation à 37°.

Résultats. — Après 24 heures d'incubation, nous avons pu dresser le tableau de résultats suivant :

Temps d'incubation à 37°	Tubes contenant 100 unités de Subtiline						Tubes contenant 5 unités de Pénicilline G						Témoin Staphylo- coque
	Sans Pénicillinase			1 goutte Pénicillinase			Sans Pénicillinase			1 goutte Pénicillinase			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
24 heures	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+

B) ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE SUR STAPHYLOCOQUE DES QUANTITÉS D'ANTIBIOTIQUES PRÉCÉDEMMENT UTILISÉES.

Technique. — Les quantités de Subtiline et de Pénicilline utilisées au cours de l'essai ont été dosées par la méthode des dilutions. Les dilutions ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles qui ont été suivies dans la première partie.

Nous avons préparé pour cela des gammes de Subtiline et de Pénicilline, dont chaque tube contenait 1 cm³ d'une dilution (gamme log. de raison 2) soit de Subtiline soit de Pénicilline; après addition de 1 cm³ de solution-tampon pH 7 et séjour d'une heure au bain-marie à 37°, on a terminé comme précédemment.

La quantité d'antibiotique introduite dans chaque tube s'est donc trouvée diluée dans 6 cm³ de milieu nutritif.

Résultats. — Nous avons noté les tubes où le Staphylocoque s'était développé après 15 heures, 24 heures, et 40 heures d'incubation.

Antibiotique	Temps d'incubation	Nombre d'unités introduites dans les tubes des gammes									Témoin
		100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	
Subtiline	16 heures	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
	24 heures	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+
	40 heures	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
Pénicilline G		5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,07	0,04	0,02	
	16 heures	0	0	0	0	0	0	+	+	+	
	24 heures	0	0	0	0	0	0	+	+	+	
	40 heures	0	0	0	0	0	+	+	+	+	

On voit que le rapport $\frac{\text{activité Subtiline}}{\text{activité Pénicilline}}$ varie dans le temps, le taux bactériostatique de la Subtiline, changeant plus rapidement que celui de la Pénicilline.

Conclusion. — Nous avons dans la première partie de cette étude utilisé des quantité de Subtiline et de Pénicilline G possédant la même activité au cours de 24 heures sur Staphylocoque, cette activité correspondant à 32 fois celle du nombre d'unités qui, répartis dans 6 cm³ du milieu nutritif utilisé ici, assurent la bactériostase du Staphylocoque au bout de 24 heures d'incubation à 37°.

Nous avons pu constater que la pénicillinase, dans les conditions de l'essai, détruit cette quantité de pénicilline dont l'absence permet alors le développement du Staphylocoque. Par contre, les milieux additionnés de Subtiline conservent leur pouvoir inhibiteur.

III

ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE DE LA SUBTILINE ET DE LA PENICILLINE G

La Subtiline présentant une action antagoniste marquée vis-à-vis de nombreux germes également sensibles à la Pénicilline, et dont les plus intéressants au point de vue thérapeutique sont représentés par le Staphylocoque, le Streptocoque et le Pneumocoque, il était intéressant d'établir une comparaison entre les activités respectives de ces deux antibiotiques. Nous avons donc, dans la plus grande partie de nos essais, examiné en parallèle notre échantillon de Subtiline et de la Pénicilline G.

La Subtiline que nous avons étudiée est constituée par le lot extrait de nos préparations, ainsi qu'il a déjà été dit (lot Dp 1759, titrant 140 unités par milligramme). La Pénicilline utilisée est la Spécilline G (titre : 1666 unités par milligramme).

ACTIVITES BACTERIOSTATIQUES ET BACTERICIDES IN-VITRO

Le pouvoir bactériostatique et bactéricide de la Subtiline vis-à-vis de nombreux germes a été étudié par JANSEN et HIRSCHMAN (59) et SALLE et JANN (109) en particulier. Ces auteurs ont montré que cette activité se révèle surtout vis-à-vis des bactéries à Gram +, les bactéries à Gram — étant peu représentées dans les germes sensibles, si ce n'est par *Neisseria gonorrhoeae*. *Mycobacterium tuberculosis* et certains alcoolo-acido-résistants seraient également sensibles à l'action de la Subtiline. Dans un autre ordre d'idées, une action trypanocide *in-vitro* a été signalée par ANDERSON et col. (3) et confirmée par LEVADITI et HENRY (66).

Nous avons examiné l'action de la Subtiline envers de nombreuses souches déjà citées, tout en cherchant à étendre ce spectre antibactérien, et avons établi une comparaison entre l'activité de

la Subtiline et celle de la Pénicilline vis-à-vis des mêmes souches et dans les mêmes conditions.

D'autre part, nous avons étudié les propriétés bactériostatiques et bactéricides exercées par la Subtiline vis-à-vis des 4 germes suivants : Staphylocoque, Streptocoque hémolytique Dig 7, Pneumocoque souche Til, enfin une souche de Streptocoque Viridans isolée d'une endocardite lente. Dans tous les cas, nous avons ainsi pu observer que la Subtiline présentait une activité bactéricide beaucoup plus notable que la Pénicilline G dans les conditions où nous l'avons essayée.

1° Activité bactériostatique exercée par la Subtiline et la Pénicilline G envers différents germes

L'étude du spectre antibactérien de ces deux antibiotiques a été réalisée à l'aide de l'agar-streak method, dont le principe a été exposé par WAKSMAN et REILLY (128).

Technique d'essai.

Des dilutions de la solution inhibitrice sont mélangées à du milieu nutritif gélosé, qui est coulé en boîtes de Pétri. Sur la surface des plaques nutritives ainsi préparées et contenant des proportions connues du produit à examiner sont ensemencés les germes dont on veut essayer la sensibilité.

Cette méthode, d'une réalisation simple, permet d'étudier simultanément l'action d'une même concentration d'antibiotique sur différents germes. On peut lui reprocher évidemment d'utiliser un milieu standard, dont la composition et le pH sont susceptibles d'influer différemment sur le développement et la bactériostase des divers organismes testés. Mais c'est là le reproche encouru par toutes les méthodes *in-vitro*, dont les résultats ne sauraient en aucun cas être absolument superposables à ceux obtenus dans les essais *in-vivo*. Il importe seulement de préciser les conditions d'expérience dont dépendent les résultats.

Ici, nous avons utilisé comme milieu nutritif, du bouillon peptoné salé gélosé :

Extrait de viande LIEBIG	3 gr.
Peptone bactériologique UCLAF	20 gr.
ClNa	5 gr.
Gélose	15 gr.
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³
pH = 7	

Pour préparer nos dilutions de solutions antibiotiques, nous avons adopté des gammes logarithmiques de raison 2, c'est-à-dire que chaque chiffre de lecture n'admet comme limite que le double de sa valeur. 1 cm³ de chaque dilution, introduit dans une boîte de Pétri stérile, est additionné de 9 cm³ de bouillon peptoné gélosé fondu et porté à une température d'environ 60°; aussitôt le milieu gélosé versé, une vive agitation par mouvement de rotation assure une bonne homogénéisation du mélange. Après durcissement, les germes essayés sont ensemencés : pour cela, on trace, sur la surface gélosée, deux traits avec une anse de platine ou une pipette Pasteur à bout recourbé, précédemment plongée dans une suspension, dans 10 cm³ d'eau salée physiologique, d'une culture sur gélose inclinée des souches en question. Après 24 heures d'incubation à 37°, on note la dernière dilution assurant la bactériostase.

Résultats.

Nous avons déterminé le nombre de cm³ de milieu nutritif gélosé dans lesquels il faut diluer 1 unité de substance active pour obtenir l'inhibition-limite. Nous avons en outre établi pour chaque

germe sensible le rapport $\frac{\text{activité sur le germe essayé}}{\text{activité sur Staphylocoque 133}}$, et, de plus, le rapport $\frac{\text{activité sur Staphylocoque 133}}{\text{activité de la Subtiline}}$, en prenant comme

base le rapport d'activité des deux antibiotiques sur la souche de Staphylocoque 133 égal à l'unité. Nous avons en effet pris comme terme de comparaison cette souche, qui est une souche de Staphylocoque pathogène que nous possédons. Nous devons donc noter que les rapports trouvés sont conventionnels et changeraient, évidemment, si nous prenions n'importe quel autre organisme comme terme de référence. Il nous a semblé néanmoins plus rationnel d'établir, entre la Pénicilline G et la Subtiline, une comparaison reposant sur une base d'activité d'ordre bactériologique plutôt que de mettre en parallèle le pouvoir antibiotique de poids identiques de ces deux substances. En effet, si dans le cas de la Pénicilline G il s'agit d'un produit pur, titrant par définition 1666 unités par milligramme, il n'en est pas de même en ce qui concerne la Subtiline : les échantillons de cette dernière obtenus jusqu'ici, tout en étant suffisamment purifiés pour permettre des essais *in-vivo*, sont loin en effet de correspondre à un produit défini, et la Subtiline pure doit posséder probablement un titre de beaucoup supérieur

aux 140 unités par milligramme de l'échantillon que nous avons essayé.

Souches microbiennes essayées	Subtiline		Pénicilline G		Rapport activité Subtiline activité Pénicil- line G
	Nombre de cm ³ dans lesquels 1 unité donne l'inhi- bition limite	Rapport <u>sensibilité</u> sensibilité du Staphy. 133	Nombre de cm ³ dans lesquels 1 unité donne l'inhi- bition limite	Rapport <u>sensibilité</u> sensibilité du Staphy 133	
Staphylocoque 133 (souche virulente) ..	0,5		30		1
Staphylocoque FDA 209 P	1,5	3	45	1,5	2
Streptococcus fecalis.	0,3	0,6	0,1	0,03	20
B. brevis	0,1	0,2	43	1,5	0,1
Sarcine blanche	0,8	1,6	25	0,8	2
Entérocoque de Thier- celin	0,2	0,4	0,4	0,01	30
B. mycoïdes	0,4	0,8	<0,1		
B. mesentericus ruber	3,2	6,4	0,6	0,02	320
Micrococcus citreus .	3	6	0,15	0,05	120
Lactobacillus casei ..	3	6	1,2	0,04	150
Myc. parasmegmatis .	0,1	0,2	<0,1		
B. mycoïdes citreus ..	0,2	0,4	3	0,1	4
B. mycoïdes albus ..	0,2	0,4	6	0,2	2
Tétragène	<0,02		13	0,5	
Neisseria catarrhalis .	<0,02		6	0,2	
B. Pyocyannique	<0,02		<0,1		
Proteus vulgaris	<0,02		<0,1		
Proteus × 19	<0,02		<0,1		
B. typhimurium	<0,02		<0,1		
Klebsiella pneumonia	<0,02		<0,1		
Escherichia coli	<0,02		<0,1		
B. lactis aerogenes ..	<0,02		<0,1		
Micrococcus conglo- meratus	<0,02				

Il ressort de ce tableau que, à activité égale sur Staphylocoque 133, la Subtiline est plus active que la Pénicilline G sur Entérocoque, Streptococcus fecalis, B.mesentericus ruber, Micrococcus citreus et Lactobacillus casei. Son activité est du même ordre que celle de la Pénicilline G sur la Sarcine blanche, B.mycoides citreus et B.mycoides albus. Par contre, la souche de Tétragène essayée, sensible à la Pénicilline, ne l'est pas du tout à la Subtiline; il en est de même de la souche de Neisseria catarrhalis.

A ce spectre antibactérien nous pouvons ajouter l'activité bactériostatique notable de la Subtiline sur le *Lactobacillus Bulgaricus*. Nous avons pu vérifier que la Subtiline, à la dose de 0,01 unité environ par cm³, empêche la coagulation du lait alors qu'elle est obtenue parallèlement sur un lait au 1/2 ensemencé par 1,5 % de *Lactobacillus Bulgaricus* et maintenu 4 heures à 45°.

Cette propriété, partagée à d'autres degrés par la Pénicilline et la Streptomycine, constitue le principe des dosages d'antibiotiques par la méthode de Sanchez, que nous avons pu appliquer au cas de dosage de la Subtiline.

Notons également l'activité bactériostatique exercée par la Subtiline sur certains Anaérobies.

Celle-ci a été mise en évidence par la méthode des dilutions, les cultures étant effectuées avec les précautions habituellement requises pour la culture des anaérobies. Les solutions actives de Subtiline et de Pénicilline ont été diluées en milieu nutritif, de manière à obtenir des gammes logarithmiques de raison 2. Puis les souches essayées ont été ensemencées à raison de 1 goutte de culture de 24 heures pour 10 cm³ de dilution en milieu nutritif.

Une souche de *Clostridium butyricum* a été inhibée après 24 heures d'incubation à 37° par 0,5 unité par cm³ de Pénicilline G et 1 unité par cm³ de Subtiline. Une souche de *Clostridium Perfringens* a été inhibée pendant le même temps et dans les mêmes conditions par 0,6 unité par cm³ de Pénicilline G et 4 unités par cm³ de Subtiline.

Signalons enfin l'effet bactériostatique de la Subtiline sur le *bacille tuberculeux*. Nous avons pu constater, en utilisant la méthode des dilutions, une bactériostase de la souche de bacille tuberculeux d'Arloing et Courmont après 4 jours de culture à 37° sur le milieu suivant :

Peptone bactériologique UCLAF		10 gr.
Glycérine		40 gr.
ClNa		5 gr.
Eau distillée		q.s.p. 1.000 cm ³

pH ajusté à 7.

Il faut toutefois atteindre une concentration d'environ 15 à 20 unités par cm³ de Subtiline pour assurer cette bactériostase, chiffre bien supérieur à celui qui a été déterminé par les auteurs américains pour inhiber la croissance d'une souche virulente de *Mycobacterium tuberculosis, var. hominis* (1-2-4-133).

2° Etude par enregistrement photométrique de l'action antibiotique exercée sur le staphylocoque par la Subtiline et la Pénicilline G

Nous avons déterminé les courbes d'évolution du Staphylocoque souche FDA 209 P, en présence de divers taux de Subtiline et de Pénicilline G.

Technique d'essai. — Nous avons ensemencé des tubes de bouillon nutritif, contenant divers taux soit de Subtiline, soit de Pénicilline G, avec la souche de Staphylocoque (à raison de environ 1 million de germes par cm³).

Le milieu nutritif employé était le suivant :

Peptone bactériologique UCLAF	20 gr.
ClNa	5 gr.
Glucose anhydre pur	2 gr.
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³
pH = 7	

A divers moments de l'incubation, l'opacité des cultures a été photométrée. Le photomètre donnant le pourcentage de lumière transmise, nous avons déduit dans chaque cas la Densité optique relative de la formule :

$$D = \log \frac{I_0}{I}, \text{ où } I_0 \text{ représente la lumière incidente et } I \text{ la lumière}$$

transmise par le milieu de culture.

Résultats. — Voir tableau et courbe, pages 77 et 78.

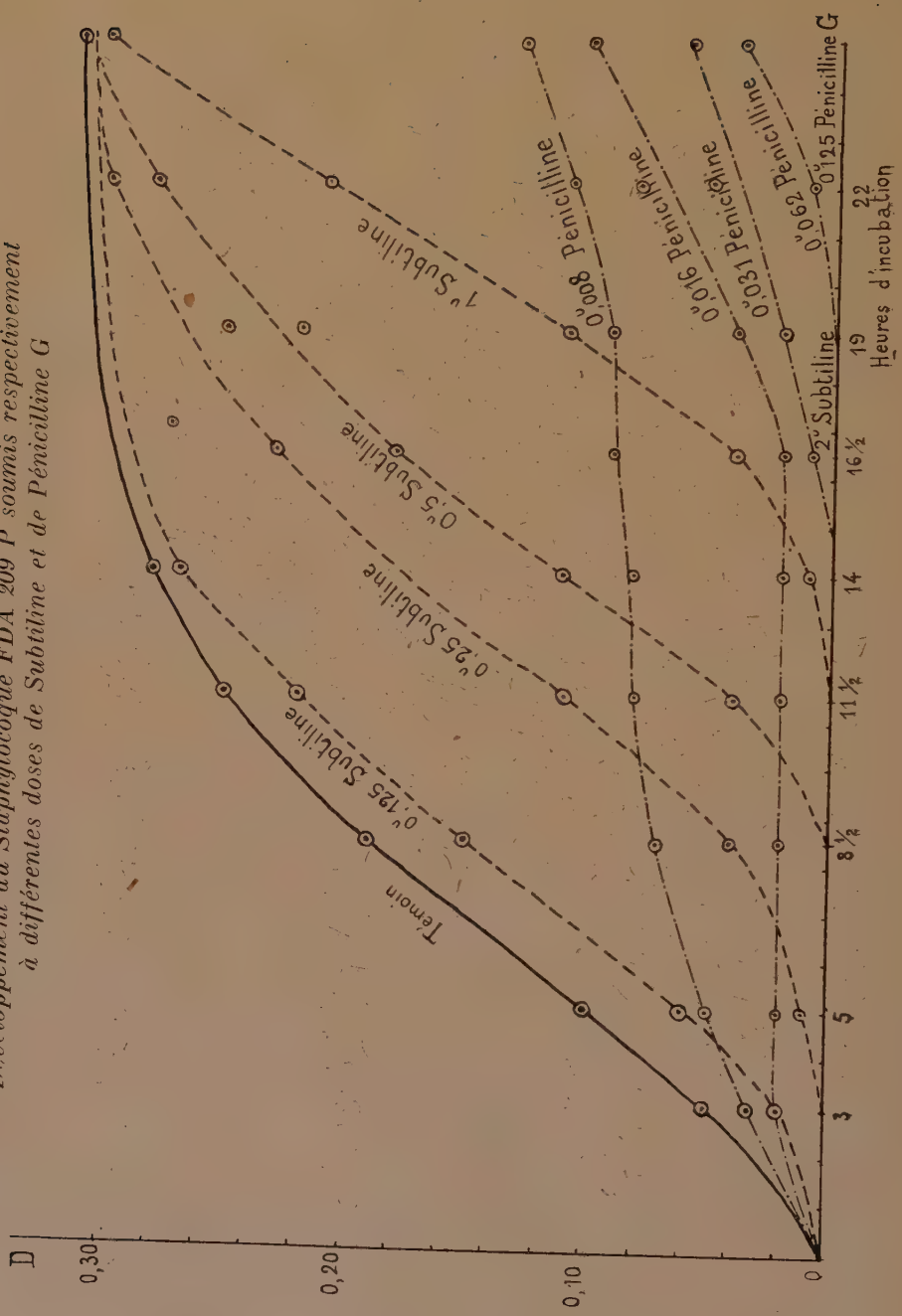
Nous voyons que, dans le cas de la Subtiline, après une bactériostase de durée variant avec la concentration en substance active, il se produit un développement d'ordre normal, les courbes d'évolution étant voisines de la courbe-témoin, et la rejoignant au terme final. Ces résultats sont en accord avec les courbes tracées par LEVADITI (66). Il s'agit d'une inhibition temporaire de nombreux germes, ou d'une action bactéricide s'adressant à un pourcentage déterminé de la population bactérienne, ou encore de l'acquisition rapide de subtilino-résistance par un certain nombre d'organismes; tous ces mécanismes et d'autres encore étant d'ailleurs susceptibles de jouer leur rôle.

Pour la Pénicilline, la densité d'ensemencement employée et la durée de l'expérience ne nous ont pas permis de retrouver les diffé-

Développement du Staphylocoque FDA 209 P soumis respectivement à différentes doses de Subtiline et de Pénicilline G

Heures d'incubation		0		3		5'		8 1/2		11 1/2		14		16 1/2		19		22		25	
		D		transmise % lumière		D		transmise % lumière		D		transmise % lumière		D		transmise % lumière		D		transmise % lumière	
1	Subtiline 2U/cc.	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
2	Subtiline 1U/cc.	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	97	0,01	90	0,04	77	0,11	61	0,24	49	0,30
3	Subtiline 0.5U/cc.	100	0	100	0	100	0	100	0	91	0,04	77	0,11	66	0,18	59	0,22	52	0,28	48	0,31
4	Subtiline 0.25U/cc.	100	0	100	0	97	0,01	90	0,04	77	0,11	65	0,18	58	0,23	55	0,25	50	0,30	49	0,30
5	Subtiline 0.125U/cc.	100	0	100	0	86	0,06	70	0,15	59	0,22	53	0,27	53	0,27	56	0,25	50	0,30	49	0,30
6	Pénicilline G 0.125U/cc.	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
7	Pénicilline G 0.062U/cc.	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	96	0,01	91	0,04
8	Pénicilline G 0.031U/cc.	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	96	0,01	94	0,02	88	0,05	86	0,06
9	Pénicilline G 0.016U/cc.	100	0	95	0,02	94	0,02	94	0,02	95	0,02	95	0,02	94	0,02	90	0,04	83	0,08	78	0,10
10	Pénicilline G 0.008U/cc.	100	0	92	0,03	89	0,05	85	0,07	83	0,08	82	0,08	81	0,09	81	0,09	76	0,11	73	0,13
Témoin Staphylocoque.		100	0	88	0,05	78	0,10	64	0,19	56	0,25	52	0,28					50	0,30	48	0,31

Développement du Staphylocoque FDA 209 P soumis respectivement
à différentes doses de Subtiline et de Pénicilline G



rentes phases d'action décrites par BONET-MAURY et PERAULT (11): bactériostase des premières générations suivie d'une lyse et reprise d'une croissance irrégulière après un certain temps. Nous n'assistons ici qu'à un début de croissance non superposable à celui du témoin, suivi de bactériostase pour certaines concentrations de Pénicilline.

Les résultats obtenus nous permettent seulement de conclure à des diagrammes photométriques différents dans le cas de la Subtiline et dans celui de la Pénicilline G.

3° Activités bactériostatique et bactéricide comparées exercées par la Subtiline et la Pénicilline G envers : Staphylocoque, Streptocoque hémolytique, Streptocoque viridans, Pneumocoque

Technique d'essai. — La détermination du pouvoir bactéricide a été effectuée d'après la technique générale suivante : diverses dilutions des substances actives sont mises en présence de l'organisme essayé, à raison de 2 gouttes de culture microbienne pour 2 cm³ de dilution, ce qui représente environ 50 à 500 millions de germes par cm³. Après un certain temps de contact à 37°, chaque dilution ensemencée est diluée dans des tubes successifs de bouillon nutritif, de manière que les dernières dilutions arrivent, dans chaque cas, en-dessous de la concentration bactériostatique de produit actif. On remet en incubation à 37°.

Le dernier tube de la première série de dilution 1/10 en milieu nutritif dans lequel la croissance microbienne est inhibée contient la dose bactériostatique de substance active.

La première concentration dont les dilutions inférieures au taux bactériostatique ne permettent pas le développement du microbe correspond à la dose bactéricide.

Les milieux nutritifs utilisés sont : le milieu R, ajusté à pH 7, dans le cas du Staphylocoque; le milieu T, ajusté à pH 7,5, pour les 3 autres germes :

<i>Milieu R :</i>	Peptone bactériologique UCLAF	20 gr.
	ClNa	5 gr.
	Glucose anhydre pur	2 gr.
	Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³

<i>Milieu T :</i>	Peptone bactériologique UCLAF	40 gr.
	ClNa	5 gr.
	Glucose anhydre pur	2 gr.
	Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³

Dans la première phase de ces essais, la dilution de la Pénicilline a été effectuée en général en eau salée physiologique, tandis que la Subtiline, insoluble en milieu aqueux en présence de 8,5 ‰ de ClNa aux concentrations utilisées, a été diluée en eau distillée. Nous nous sommes demandé par la suite si la présence de ClNa influait sur l'insensibilité relative des divers germes vis-à-vis de la phase bactéricide. Mais au cours d'essais ultérieurs, nous avons pu vérifier que la Pénicilline G n'était pas plus bactéricide vis-à-vis du Staphylocoque et du Pneumocoque en particulier lorsque les dilutions étaient effectuées en eau distillée au cours de cette phase de contact.

RÉSULTATS.

Nous ne citons dans chaque cas qu'un seul essai qui résume l'ensemble des autres.

a) ACTIVITÉ SUR STAPHYLOCOQUE, SOUCHE FDA 209 P.

Contact primitif du microbe et des dilutions actives pendant 1 heure à 37°. Puis dilutions en milieu R. Lecture après 3 jours d'incubation à 37°.

Subtiline

Dilutions en m. R.	Doses de Subtiline en unités par cm ³									Témoins	
	1025	512	256	128	64	32	16	8	4	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	0	+	+	+	+	+			+	+
1/100.000	0	0								+	+
1/1.000.000	0	0								+	+

0 = aucun développement microbien,
+ = culture microbienne développée.

Taux bactériostatique = 3,2 unités par cm³

Taux bactéricide = 512 unités par cm³

activité bactériostatique 3,2 1

Rapport ————— = ————— = —————

activité bactéricide 512 160

Pénicilline

Dilutions en m. R.	Doses de Pénicilline G en unités par cm³															Té- moins	
	6500	3250	1625	812	406	203	102	51	25,5	12,7	6,4	3,2	1,6	0,8	A	B	
1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	
1/100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	
1/1.000	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/10.000	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+				+	+
1/100.000	0	0	0	+	+	+	+	+								+	+
1/1.000.000	+	+	+	+	+	+										+	+

Taux bactériostatique = 0,16 unité par cm³

Taux bactéricide $\geq$ 6.500 unités par cm³

activité bactériostatique 0,16 1

Rapport $\frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}} = \frac{0,16}{6,500} \approx \frac{1}{40.000}$

S'opposant au rapport bactériostatique bactéricide très peu favorable dans

les conditions d'essai pour la Pénicilline, la Subtiline présente donc ce même rapport voisin de 1/150.

b) ACTIVITÉ SUR STREPTOCOQUE HÉMOLYTIQUE, SOUCHE DIG 7.

Comme précédemment, nous avons cherché à déterminer la concentration capable de produire une action bactéricide en 1 heure à 37° sur la souche microbienne.

Les dilutions ont été effectuées en milieu T. La lecture a été faite après 4 jours d'incubation à 37°.

Au cours des premiers essais, nous avons constaté des anomalies dans les résultats concernant la Subtiline. En effet, au fur et à mesure que l'on s'approchait de la dose bactéricide, les dilutions en milieu nutritif cultivaient à un bien moindre degré que les dilutions des témoins. Pensant que ceci pouvait être dû à des variations du développement microbien liées au taux d'ensemencement, nous avons effectué parallèlement des essais-témoins correspondant aux mêmes taux d'ensemencement et aux mêmes dilutions, mais effectuées sans contact préalable du microbe et de la substance active.

Nous avons constaté un développement normal jusqu'à la dilution 10^{-6} des plus fortes doses de Subtiline. Nous pensons donc que le premier tableau traduit seulement une forte action bactéricide, ne laissant survivre que des quantités très diminuées de germes à mesure que les doses d'essai approchent de la dose bactéricide limite.

Subtiline

Essai bactéricide												
Dilutions en m. T.	Doses de Subtiline en unités par cm ³										Témoins	
	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,7	0,27	0,09	0,03	0,01	A	B
1/10	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+

Témoin bactériostatique												
Dilutions en m. T.	Doses de Subtiline en unités par cm ³										Témoins	
	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,03	0,01	A	B
1/10	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Taux bactériostatique = 0,21 unité par cm³

Taux bactéricide = 18,9 unités par cm³

activité bactériostatique 0,21 1

Rapport $\frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}} = \frac{0,21}{18,9} = \frac{1}{90}$

Pénicilline

Essai bactéricide												
Dilutions en m. T.	Doses de Pénicilline G en unités par cm ³										Témoins	
	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,03	0,01	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Témoin bactériostatique												
Dilutions en m. T.	Doses de Pénicilline G en unités par cm ³										Témoins	
	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,03	0,01	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Taux bactériostatique = 0,027 unité par cm³

Taux bactéricide $\geq$ 170 unités par cm³

activité bactériostatique 0,027 1

Rapport $\frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}} = \frac{0,027}{170}$ ou $\frac{1}{63.000}$

bactériostatique

Comme dans le cas du Staphylocoque, le rapport $\frac{\text{bactériostatique}}{\text{bactéricide}}$ est en faveur de la Subtiline.

c) ACTIVITÉ SUR PNEUMOCOQUE, SOUCHE TIL.

Contact primitif de 1 heure à 37° entre les substances actives et la souche sensible. Dilutions en milieu T. Lecture après 48 heures à 37°.

Nous obtenons ici encore, pour la Subtiline, un tableau de ré-

sulfats dont l'allure est comparable à celle du tableau du Streptocoque hémolytique, mais qui traduit une activité bactéricide supérieure à celle qui a été mise en évidence vis-à-vis de ce dernier genre.

Ainsi que nous l'avons expliqué plus haut, nous avons essayé comparativement l'action bactéricide de la Pénicilline en solution en eau distillée ou en eau salée, et n'avons pas trouvé de différence significative entre les modes de réponse du Pneumocoque dans l'un ou l'autre cas. Le tableau que nous donnons ici traduit un essai où la Subtiline et la Pénicilline ont également été diluées en eau distillée durant la phase bactéricide.

Subtiline

Essai bactéricide											
Dilutions en m. T.	Doses de Subtiline en unités par cm ³									Témoins	
	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,03	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/10.000	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/100.000	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/1.000.000	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+

Témoin bactériostatique											
Dilutions en m. T.	Doses de Subtiline en unités par cm ³									Témoins	
	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,03	A	B
1/10	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/100	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Taux bactériostatique : 0,07 unité par cm³

Taux bactéricide : 2,1 unités par cm³

Rapport $\frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}} = \frac{0,07}{2,1} = \frac{1}{30}$

Pénicilline

Essai bactéricide													Té- moins	
Dilutions en m. T.	Doses de Pénicilline G en unités par cm ³													
	4590	1530	510	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,02	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000.000	0	0	0										+	+

Témoin bactériostatique													Té- moins	
Dilutions en m. T.	Doses de Pénicilline G en unités par cm ³													
	4590	1530	510	170	56,7	18,9	6,3	2,1	0,71	0,27	0,09	0,03	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000.000	+	+	+										+	+

Taux bactériostatique = 0,027 unité par cm³

Taux bactéricide = 1.530 unités par cm³

$$\text{Rapport} = \frac{\text{activité bactériostatique} \quad 0,027 \quad 1}{\text{activité bactéricide} \quad 1.530 \quad 56.000}$$

La Subtiline présente donc une action bactéricide remarquable, le rapport $\frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}}$ étant égal à 1/30, alors que nous

le trouvons ici de l'ordre de 1/60.000 pour la Pénicilline G, soit une différence de 2.000 fois entre les activités bactéricides respectives de ces deux substances antibiotiques dans les conditions d'essai.

d) ACTIVITÉ SUR STREPTOCOQUE VIRIDANS.

La souche utilisée a été isolée d'une endocardite lente. C'est une souche pénicillino-sensible, et en même temps subtilino-sensible : des essais bactériostatiques précédents effectués par la méthode par dilution avec des gammes logarithmiques de raison 1,2 nous ont permis d'obtenir dans des conditions identiques une bactériostase en 16 heures avec 2,5 unités par cm^3 de Pénicilline G et 4,1 unités par cm^3 de Subtiline.

Nous avons examiné les pouvoirs bactéricides respectifs de la Subtiline et de la Pénicilline G sur cette souche, suivant la technique générale exposée plus haut : contact de 4 heures à 37° des dilutions actives avec l'organisme (1 goutte de culture de 24 heures à 37° en milieu T pour 1 cm^3 de dilution). Puis dilutions en milieu T.

Lecture après 3 jours à 37° .

Subtiline

Dilutions en m. T.	Doses de Subtiline (unités/ cm^3)							Témoins	
	1.000	500	250	125	62,5	31,2	15,6	A	B
1/10	0	0	0	+	+	+	+	+	+
1/100	0	0	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	+	+	+			+	+
1/10.000	0	0	0	+	+			+	+
1/100.000	0	0						+	+

Taux bactériostatique : 25 unités par cm^3 (il faut toutefois noter qu'en 16 heures la bactériostase était assurée par seulement 6 unités par cm^3 de Subtiline).

Taux bactéricide : 500 unités par cm^3 .

$$\text{Rapport} = \frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}} = \frac{25}{500} = \frac{1}{20}$$

Pénicilline G

Dilutions en m. T.	Doses de Pénicilline G en unités par cm ³												Té- moins	
	10.000	5000	2500	1250	625	312	156	78	39	19,5	10	5	A	B
1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
1/100	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1.000.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Taux bactériostatique = 3,9 unités par cm³

Taux bactéricide ≥ 10.000 unités par cm³

activité bactériostatique 3,9 1

Rapport $\frac{\text{activité bactériostatique}}{\text{activité bactéricide}} = \frac{3,9}{10.000} = 0,00039$

Peut-être le pouvoir bactéricide notable qu'exerce là encore la Subtiline permet-il d'espérer d'elle un effet thérapeutique intéressant dans le cas des infections à Streptocoque viridans.

CONCLUSIONS.

Il ressort de nos essais que la Subtiline présente un pouvoir bactéricide beaucoup plus marqué que la Pénicilline G. Contrairement à la première, celle-ci en effet s'est montrée peu bactéricide en 1 heure, dans les conditions où nous avons opéré. Ce fait est d'ailleurs en accord avec les résultats de nombreux auteurs, en particulier EAGLE (30) qui a déterminé les temps de bactéricidie sur divers germes de nombreuses concentrations de Pénicilline, et les a trouvés en général supérieurs à ce délai.

4° Activité de la Subtiline

sur des souches de Staphylocoque pénicillino-résistantes

Les représentants d'un groupe bactérien sensible à une substance antibiotique ne répondent en général pas tous de la même manière à des doses identiques de cette substance. Le taux actif

varie suivant les individus, dont certains sont susceptibles de présenter un degré de résistance élevé, contrairement à d'autres souches qui leur sont morphologiquement semblables.

Cette résistance peut être naturelle ou acquise. En effet, à côté des souches qui naturellement ne répondent pas à l'action inhibitrice d'un antibiotique comme le font les autres souches du même groupe, on sait qu'un grand nombre de germes sensibles sont capables d'acquérir un certain degré de résistance à une substance active, variable suivant les souches, lorsqu'ils végètent en présence de doses sub-actives de cette substance.

L'acquisition de résistance *in-vivo* et *in-vitro* a été démontrée pour de nombreux germes en ce qui concerne la Pénicilline. Dernièrement, SALLE et JANN (115) ont montré qu'il en était de même pour le *Staphylocoque*, *Myc. Phlei*, *Escherichia communior*, en présence de Subtiline.

Nous avons d'une part examiné la sensibilité à la Subtiline de souches de *Staphylocoque* isolées de diverses infections et naturellement résistantes à la Pénicilline. D'autre part, en utilisant la méthode classique des repiquages successifs sur bouillons nutritifs de plus en plus riches en antibiotique, nous avons pu obtenir des souches manifestant une résistance soit à la Subtiline, soit à la Pénicilline : l'essai de la susceptibilité des nouvelles souches vis-à-vis de ces deux derniers antibiotiques nous a permis de conclure que la pénicillino-résistance et la subtilino-résistance ne sont pas concurremment acquise.

A) ACTIVITÉ DE LA SUBTILINE SUR DES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUE NATURELLEMENT PÉNICILLINO-RÉSISTANTES.

Les 3 souches essayées ont été isolées de diverses infections; elles donnent positifs les tests du pouvoir pathogène des *Staphylocoques* : fermentation de la mannite et coagulation du plasma citraté. Leur sensibilité à la Pénicilline G et à la Subtiline a été déterminée par la méthode des dilutions en suivant une gamme logarithmique de raison 2. Le milieu nutritif employé correspond à notre formule R (voir page 79). L'essai a été effectué parallèlement avec une souche de *Staphylocoque* particulièrement sensible, la souche 209 P indiquée par la Food and Drug Administration pour le dosage de la Pénicilline.

Les taux d'antibiotiques nécessaires pour assurer la bactériostase

après 16 heures de culture sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Souches de Staphylocoque	Taux bactériostatique de Pénicilline après 16 heures de culture	Taux bactériostatique de Subtiline après 16 heures de culture
	unités par cm ³	unités par cm ³
209 P (souche FDA)	0,09	3
M 4	18	25
M 12	72	25
M 15	72	25

Il ressort de ces résultats que les 3 souches essayées, et qui sont 200 et 800 fois moins sensibles à la Pénicilline que la souche FDA 209 P, ne sont que 8 fois moins sensibles à la Subtiline que cette dernière souche.

B) ACTIVITÉ DE LA SUBTILINE SUR UNE SOUCHE AYANT ACQUIS UNE RÉSISTANCE A LA PÉNICILLINE.

La souche utilisée est la souche de Staphylocoque 133 (de l'Institut Pasteur). Nous lui avons fait acquérir un certain degré de résistance vis-à-vis de la Pénicilline et de la Subtiline, en la maintenant sur des milieux additionnés de doses sub-actives de ces antibiotiques; cette souche sensible a ainsi été placée dans des conditions analogues à celles où elle se trouve lorsqu'elle est traitée *in-vivo* par des doses insuffisantes de produit actif.

a) Acquisition de pénicillino- et subtilino-résistance par la souche de Staphylocoque 133.

Nous avons préparé des gammes de dilution des produits actifs en bouillon peptoné salé; l'ensemencement a été réalisé avec 1 goutte par tube (5 cm³) d'une dilution à 1/50 du premier tube vigoureusement développé de la souche résistante précédente. Les repiquages ont été effectués tous les 3 à 4 jours environ.

Après plusieurs passages, nous avons finalement obtenu une variété de la souche de Staphylocoque 133 16 fois plus résistante à la Pénicilline que la souche de départ, et une autre 100 fois plus résistante à la Subtiline.

b) Action de la Subtiline et de la Pénicilline sur les variétés résistantes obtenues.

Nous avons pu constater que, si l'acquisition d'une résistance se manifestait aussi bien pour la Subtiline que pour la Pénicilline, cette acquisition vis-à-vis de l'un de ces antibiotiques n'entraîne

pas une résistance pour l'autre. Ceci a été démontré en essayant les souches citées plus haut par la méthode des dilutions (gammes logarithmiques de raison 2; le milieu nutritif utilisé était le bouillon peptoné salé).

En même temps que ces souches pénicillino- et subtilino-résistantes, nous avons utilisé comme terme de comparaison la souche de Staphylocoque 133 ayant parallèlement subi des repiquages analogues sur milieux non additionnés d'antibiotiques.

Dans le tableau ci-dessous, nous indiquons les taux d'antibiotiques nécessaires pour assurer une bactériostase après 6 jours d'incubation à 37°.

Souches de Staphylocoque	Taux bactériostatique de Pénicilline après 6 jours d'incubation unités par cm ³	Taux bactériostatique de Subtiline après 6 jours d'incubation unités par cm ³
Staphylocoque 133	0,1	4
Souche pénicillino-résistante.	1,6	2
Souche subtilino-résistante .	0,1	500

5°) Effet du sérum sur le pouvoir bactériostatique de la Subtiline et de la Pénicilline

De nombreux antibiotiques sont capables de former un complexe avec les protéines du sérum. Ce fait a été démontré en ce qui concerne les sulfamides (DAVIS : 20-21) et la Pénicilline (CHOW et Mc KEE : 16). La fraction combinée est susceptible de montrer une diminution de ses propriétés antibiotiques, ainsi que TOMPSETT, SHULTZ et Mc DERMOTT l'ont établi pour les diverses pénicillines (122).

Nous avons pu observer un phénomène analogue en ce qui concerne la Subtiline. Pour cela, nous avons appliqué le procédé utilisé par ces derniers auteurs.

Technique d'essai.

L'action bactériostatique de la Subtiline et de la Pénicilline a été essayée vis-à-vis du Streptocoque hémolytique d'une part sur bouillon peptoné salé additionné de 2 % de sang de lapin défibriné, d'autre part sur le même bouillon peptoné additionné de 10-20-30 % de sérum de lapin.

La quantité de substance active nécessaire pour assurer la bactériostase a été déterminée par la méthode des dilutions. La gamme utilisée est la suivante :

1/25 - 1/33 - 1/50 - 1/66 - 1/100 - 1/125 - 1/166 - 1/250 - 1/333 - 1/500

L'ensemencement est réalisé en introduisant dans chaque tube 1/5^e en volume d'une dilution 10⁻⁶ dans le milieu d'essai d'une culture de 24 heures sur bouillon-sérum de Streptocoque hémolytique (souche Dig. 7, de l'Institut Pasteur).

Nous avons établi pour chaque milieu au sérum le rapport :
quantité bactériostatique sur bouillon à 2 % de sang

× 100

» » » » add. de sérum

Ce rapport traduit le pourcentage d'activité de l'antibiotique en présence de la quantité essayée de sérum.

Un essai identique a été effectué dans des conditions analogues sur milieu T additionné ou non des mêmes quantités de sérum.

Résultats.

Les résultats obtenus sont donnés dans les 2 tableaux suivants :

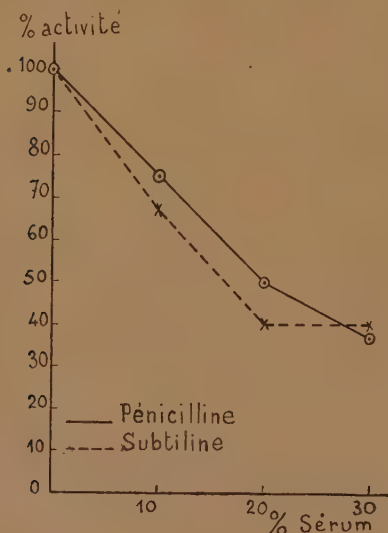
Tableau I. — Effet sérum sur Pénicilline G et Subtiline
(milieu nutritif de base = bouillon peptoné + 2 % de sang de lapin)

Milieu	Concentration bactériostatique unités par cm ³	% activité
Bouillon au sang (Témoin)	Pénicilline 0,004 Subtiline 0,3	
Bouillon + 10 % sérum	Pénicilline 0,006 Subtiline 0,04	67 % 75 %
Bouillon + 20 % sérum	Pénicilline 0,01 Subtiline 0,06	40 % 50 %
Bouillon + 30 % sérum	Pénicilline 0,01 Subtiline 0,08	40 % 37 %

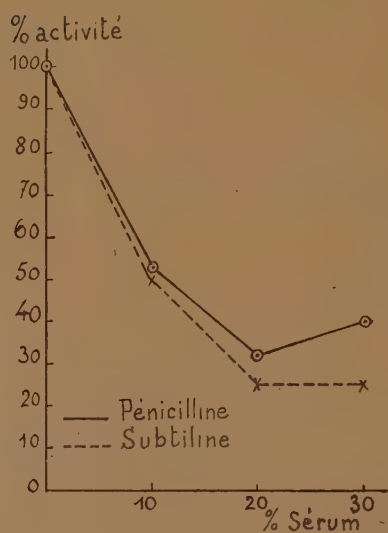
Tableau II. — Effet sérum sur Pénicilline G et Subtiline
(milieu nutritif de base = milieu T)

Milieu	Concentration bactériostatique unités par cm ³	% activité
Milieu T (Témoin)	Pénicilline 0,008 Subtiline 0,015	
Milieu T + 10 % sérum	Pénicilline 0,015 Subtiline 0,030	53 % 50 %
Milieu T + 20 % sérum	Pénicilline 0,025 Subtiline 0,06	32 % 25 %
Milieu T + 30 % sérum	Pénicilline 0,02 Subtiline 0,06	40 % 25 %

Courbe I
Effet-sérum sur Pénicilline G
et Subtiline
(milieu nutritif de base = bouillon
peptoné + 2 % de sang de lapin).



Courbe II
Effet-sérum sur Pénicilline G
et Subtiline
(milieu nutritif de base = milieu T)



CONCLUSION.

Aux écarts d'expérience près, nous avons pu observer, sur les 2 séries de milieux essayés, une évolution analogue du pourcentage d'efficacité, aussi bien de la Pénicilline G que de la Subtiline, vis-à-vis du Streptocoque hémolytique.

Il serait intéressant d'effectuer une expérience parallèle avec du sérum humain ou du liquide d'ascite pour situer cette réaction sur le plan clinique, encore que les résultats escomptés en thérapeutique d'après des essais *in-vitro* restent toujours du domaine de l'hypothèse.

ACTIVITE IN-VIVO DE LA SUBTILINE

L'activité in-vivo de la Subtiline a été vérifiée par SALLE et JANN (111-112-113). Après avoir établi la faible toxicité de ce produit sur le tissu embryonnaire de cœur de poulet, ces auteurs obtinrent par injections répétées la survie de souris infectées par le *Streptocoque hémolytique*, le *Pneumocoque* type III, de même que de cobayes infectés par *B.anthraxis*. SALLE décela également une certaine action sur la tuberculose du cobaye. Dans un autre domaine, ANDERSON et col. obtinrent la guérison d'un singe infecté par *Entamœba histolytica* (3). De plus, l'action bactéricide de la Subtiline sur *Treponema pallidum* a pu être notée in-vivo (29); par contre, on n'a pu que constater l'inactivité de cet antibiotique dans le traitement de *Trypanosoma equiperdum* (3).

Personnellement, nous avons étudié l'activité de la Subtiline sur des souris infectées avec du *Staphylocoque*, du *Streptocoque*, du *Pneumocoque*. Nous avons cherché à déterminer, dans chaque cas, la dose assurant la survie de 50 % des souris traitées, et avons comparativement étudié l'action de la Pénicilline G dans les mêmes conditions d'essai.

Au contraire de SALLE qui injectait par voie intra-péritonéale à la fois le microbe infectant et la Subtiline, il nous a semblé plus logique d'administrer cette dernière par voie sous-cutanée; nous sommes sûrs de cette manière que l'effet obtenu correspond bien à la diffusion du produit dans l'organisme par l'intermédiaire des mécanismes vitaux, et qu'il ne s'agit pas uniquement d'une inactivation locale du microbe par la substance antibiotique.

Avant d'effectuer ces essais, nous avons vérifié le taux relativement peu élevé de la toxicité du produit dont nous nous sommes servi.

Toxicité de la Subtiline

La toxicité très faible de la Subtiline a été mise une première fois en évidence par SALLE et JANN (110) sur embryon de poulet. Une étude plus approfondie, consécutive à l'administration parentérale chez le lapin et la souris, a été effectuée récemment par WILSON et col. (131).

Nous-même avons eu pour principal objet de nous assurer de l'absence de toxicité de notre produit dans les conditions où nous l'avons utilisé. Après avoir vérifié l'innocuité par voie sous-cutanée de doses très supérieures à celles qui ont été administrées au cours de nos essais d'activité, nous avons établi la dose léthale 50 % de notre Subtiline administrée par voie intra-veineuse.

a) PAR VOIE SOUS-CUTANÉE :

6 souris ont reçu par voie sous-cutanée 100 mgr. de Subtiline (produit dissous en eau distillée), 6 autres, de la même manière, 50 mgr.

Nous avons constaté 1 mort le 6^e jour parmi les 6 souris ayant reçu 100 mgr. de produit ; aucune autre n'a été enregistrée parmi les 11 autres souris des deux essais au bout de 14 jours.

Toutes les souris traitées ont présenté une escarre au point d'inoculation ; mais, à part cela, elles n'ont pas manifesté d'autres troubles apparents.

C

Il semble donc que le coefficient — soit très favorable dans le

T

cas de la Subtiline, les doses supportées ici étant beaucoup plus élevées que les doses curatives.

b) PAR VOIE INTRA-VEINEUSE :

De la Subtiline dissoute en eau distillée a été injectée par voie intra-veineuse à des souris (les doses indiquées sont réparties dans 1 cm³ d'eau distillée et correspondent à 20 gr. de souris; elles ont été fractionnées proportionnellement aux poids respectifs des animaux traités).

Sur 6 souris ayant reçu 0,5 mgr/20 gr. nous avons constaté 6 morts, soit 100 % ; sur 6 souris ayant reçu 0,25 mgr/20 gr. : 3 morts, soit 50 % ; 6 souris n'ayant reçu que 0,125 mgr/20 gr. ont survécu.

Les morts sont survenues au moment même de l'injection, et les souris survivantes ne présentaient aucun trouble apparent 6

jours après. Les doses léthales correspondant à la solubilité du produit en présence de 8,5 ‰ de ClNa , nous pensons qu'il s'agit d'une précipitation ayant causé une embolie.

Nous remarquons une différence de toxicité avec la Subtiline utilisée par ANDERSON (3); ce dernier, en effet, avait établi la LD_{50} du lot qu'il avait examiné à 60 ± 3 mgr/kg par voie intra-veineuse, et à 670 ± 30 mgr/kg par voie sous-cutanée.

Des discordances existent également avec les conclusions de WILSON et col. (131). Toutes proviennent vraisemblablement de ce que les produits actifs utilisés dans chaque cas contenaient des quantités variables d'impuretés.

Comparaison du degré d'activité in-vivo de la Subtiline et de la Pénicilline G sur Pneumocoque, Streptocoque hémolytique, Staphylocoque

Nous avons, dans chaque cas, cherché à déterminer la dose qui, injectée en une seule fois simultanément à l'infection, assurait la survie de 50 % des souris traitées. Nous avons porté les résultats obtenus avec les diverses doses essayées sur le papier logarithmique-probabilité établi par BONET-MAURY pour la détermination des courbes de toxicité (10). Des courbes d'activité qu'ils nous ont permis de tracer, nous avons pu déduire, d'une manière approximative mais suffisante, la dose curative 50 %.

Dans le cas de la Subtiline, cette dose a été assez facilement déterminée, la courbe obtenue présentant une pente assez nette et assez constante. Dans le cas de la Pénicilline par contre, nous avons noté beaucoup plus d'irrégularités, la courbe traduisant l'activité étant dans ces conditions beaucoup plus inclinée, et la dose curative 50 % ne pouvant en être déduite qu'avec peu de précision.

Résultats. — Le nombre des souris survivantes, relevé au bout de huit jours, permet de déterminer la dose de substance antibiotique assurant la survie de 50 % des souris traitées. Nous donnons dans chaque cas le tableau de l'évolution d'un essai caractéristique, afin de montrer, outre le pourcentage de survie finale, la survie partielle causée par l'injection de chaque dose. Dans les tableaux chaque colonne représente une souris. La survie est donnée en jours par la hauteur des colonnes.

Activité in-vivo sur Pneumocoque

Organisme d'essai. — *Diplococcus pneumoniae*, souche Til (Inst. Pasteur). La virulence de la souche est entretenue par passage sur souris chaque mois. Une hémoculture est obtenue par repiquage en bouillon-sérum d'une goutte de sang du cœur de la souris infectée. Après incubation à 37°, cette culture est additionnée de 2 parties de bouillon gélatiné à 10 % et conservée en ampoules scellées, qui sont maintenues en glacière. C'est le repiquage sur bouillon-sérum de cette souche gélatinée qui constitue la souche microbienne utilisée dans chaque essai.

Technique. — Pour produire l'infection, nous utilisons une culture de 24 heures en bouillon-sérum, dont on injecte à chaque souris, par voie intra-péritonéale, 0,5 cm³ d'une dilution à 10⁻⁵ en eau physiologique. Afin de contrôler la virulence de la souche, d'autres souris reçoivent par le même moyen, 1 cm³ de dilution 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, de la même culture. Les souris d'essai sont infectées par environ 1.000 doses minima mortelles; la mort des témoins survient en 24 à 40 heures.

Le traitement est effectué par voie sous-cutanée, aussitôt après l'infection. Les doses sont indiquées pour 20 grammes de souris. Chaque souris est pesée et reçoit la dose d'essai proportionnellement à son poids. Les solutions de Subtiline injectées sont préparées en eau distillée, les solutions de Pénicilline en eau salée physiologique.

RÉSULTATS.

a) *Détermination de la dose de Subtiline assurant 50 % de survie.*

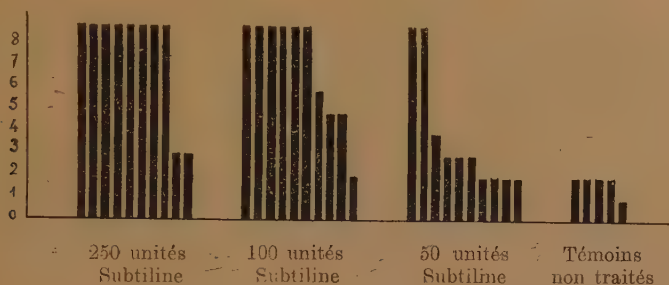
La courbe d'activité a été déterminée avec la moyenne des résultats de 3 essais. Nous indiquons, pour chaque dose essayée, le nombre de souris survivantes par rapport au nombre de souris essayées.

N° essai	500 unités	250 unités	200 unités	100 unités	50 unités	Témoins
1	6/6	6/6	—	—	—	0/5
2	—	8/10	—	6/10	2/10	0/5
3	—	—	8/10	7/10	3/10	0/5
Total des 3 essais	6/6	14/16	8/10	13/20	5/20	
% survie	100 %	87 %	80 %	65 %	25 %	

De la courbe d'activité tracée sur le papier logarithmique-probabilité de BONET-MAURY, nous déduisons le titre de 80 unités pour la dose curative 50 % (voir page 103).

Evolution de l'essai N° 2

(Doses indiquées pour 20 gr. de souris. Chaque colonne représente une souris. La survie est donnée en jours par la hauteur des colonnes).



b) Détermination de la dose de Pénicilline G assurant 50 % de survie.

Dans le cas de la Pénicilline, nous avons noté plus d'irrégularités. La courbe d'activité a toutefois pu être tracée d'après les essais suivants :

N° essais	8.000 unités	4.000 unités	2.000 unités	1.000 unités	500 unités	Témoins 80 unités Subtiline	Témoins non traités
4			3/10	2/10	1/10	7/10	0/5
5	10/10	7/10	2/10	2/10	1/10	5/10	0/10
Total des 2 essais	10/10	7/10	5/20	2/10	2/20	12/20	
% survie	100 %	70 %	25 %	20 %	10 %	60 %	

Dans chacun de ces 2 essais, nous avons traité 10 souris avec 80 unités de Subtiline (dose curative 50 % précédemment déterminée) afin de nous assurer que la souche de Pneumocoque gardait le même ordre de grandeur de sensibilité à la Subtiline que précédemment.

D'après ces derniers essais, il semble que environ 2.400 unités de Pénicilline assurent, dans les mêmes conditions, le même pourcentage de survie, soit environ 50 %, que 80 unités de Subtiline.

Ainsi, la Subtiline agirait in-vivo comme environ 30 fois son équivalent en unités de Pénicilline G. Cette proportion s'oppose au rapport d'activité in-vitro, déterminé par la méthode des dilutions, où nous avons vu que la bactériostase du Pneumocoque était assurée par 3 fois moins d'unités de Pénicilline G que de Subtiline (Doses bactériostatiques in-vitro : 0,07 unité par cm³ pour la Subtiline — 0,02 unité par cm³ pour la Pénicilline — voir pages 84 et 85).

RÉSULTATS.

a) Détermination de la dose de Subtiline assurant 50 % de survie.

La moyenne des résultats de divers essais nous a permis de tracer une courbe d'après laquelle nous avons estimé à 40 unités la dose assurant la survie de 50 % des souris (voir page 103).

N° essais	150 unités	100 unités	50 unités	30 unités	25 unités	Témoins
1	5/5	7/8	2/8			0/5
2		7/7	8/10			0/5
3		4/6				0/5
4	10/10	10/10	9/10		3/10	0/5
5				4/10		0/5
6				4/10		0/5
Total des essais	15/15	28/31	19/28	8/20	3/10	
% survie	100 %	90 %	68 %	40 %	30 %	

b) Détermination de la dose de Pénicilline G assurant 50 % de survie.

Comme dans le cas du Pneumocoque, nous avons noté plus d'irrégularités dans le cas de la Pénicilline. La courbe d'activité de la Pénicilline G sur le Streptocoque hémolytique a été tracée d'après l'essai suivant :

N° essai	600 unités	400 unités	200 unités	100 unités	Témoins
4	8/10	5/10	4/10	3/10	0/5
% survie	80 %	50 %	40 %	30 %	

La dose curative 50 % déduite de notre courbe est de l'ordre de 240 unités pour la Pénicilline, soit environ 6 fois plus d'unités que dans le cas de la Subtiline (voir page 103).

Là encore, nous observons de la part de la Subtiline une plus grande activité *in-vivo* que celle que nous avons déterminée *in-vitro*, par rapport à la Pénicilline G (Doses bactériostatiques précédemment déterminés par la méthode des dilutions : Pénicilline : 0,027 unité par cm³ — Subtiline : 0,21 unité par cm³ — voir pages 82 et 83).

de cette dilution. Des souris témoins de virulence reçoivent 1 cm³ de dilution 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ de la même souche.

Aussitôt après l'infection, on administre par voie sous-cutanée les doses voulues soit de Subtiline dissoute en eau distillée, soit de Pénicilline G en solution en eau salée physiologique. Le pourcentage des souris survivantes est déterminé au bout de 8 jours.

RÉSULTATS.

a) Détermination de la dose de Subtiline assurant 50 % de survie.

Cette dose a été établie d'après la courbe moyenne traduisant les 3 essais suivants :

N° essais	400 unités	200 unités	100 unités	50 unités	Témoins
1	7/10	7/10	5/10	4/10	0/5
2	6/10		4/10	1/10	0/5
3	7/10	4/10	1/10	0/10	0/5
Total des essais	20/30	11/20	10/30	5/30	
% survie	66 %	55 %	33 %	16 %	

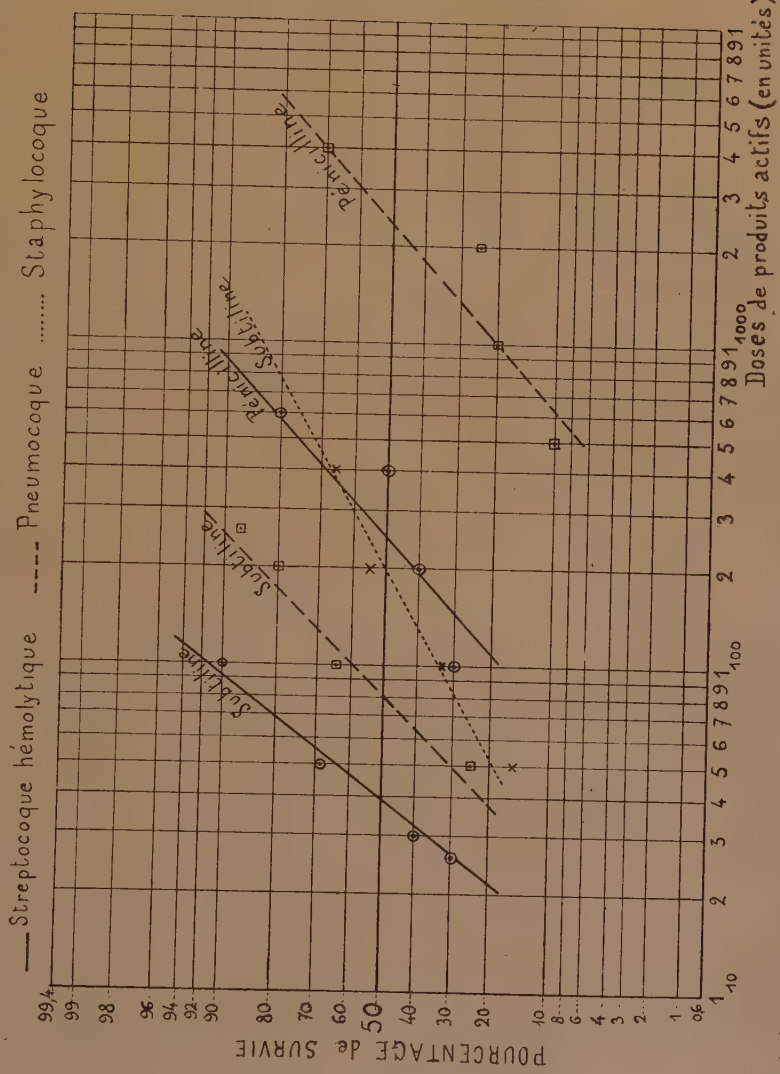
D'après ces résultats, nous pouvons évaluer la dose curative 50 % à environ 200 unités. Remarquons que la pente de la courbe d'activité sur Staphylocoque est beaucoup plus faible que celle des courbes traduisant l'activité sur Streptocoque ou Pneumocoque (voir page 103).

b) Détermination de la dose de Pénicilline assurant 50 % de survie.

Nous n'avons pas obtenu de courbe d'action définie avec la Pénicilline. Dans les 2 essais qui suivent, des doses très diverses conduisent à des proportions de souris survivantes sensiblement identiques ; il nous est donc impossible de tracer une courbe d'activité d'après ces résultats.

N° essais	400 unités	200 unités	100 unités	50 unités	25 unités	Témoins
3	7/10	9/10	8/10	8/10		0/5
4		4/10	4/10	4/10	5/10	0/5

Détermination de la dose curative 50 % de Pénicilline G et de Subtiline vis-à-vis du Streptocoque hémolytique, du Pneumocoque et du Staphylocoque



Courbe établie en utilisant le graphique du papier Log-Probabilité pour courbe de toxicité. D'après P. Bonet-Maury (10)

Elimination de la Subtiline Administration en Subtosan-retard

L'élimination de la Subtiline a été appréciée de la manière suivante : nous avons infecté avec du Streptocoque hémolytique des souris auxquelles une même dose de Subtiline en eau distillée avait été administrée par voie sous-cutanée à divers intervalles avant l'infection. Nous avons ainsi pu constater qu'une grande partie de la Subtiline injectée était rapidement éliminée. L'essai cité ci-dessous, où le nombre des souris survivantes au bout de 8 jours passe de 90 % à 10 % pour l'injection d'une même dose de Subtiline, soit simultanément à l'injection, soit 3 heures avant, met bien en évidence cette rapidité d'élimination qui rappelle celle de la Pénicilline.

C'est pourquoi nous avons essayé de voir si l'administration de la Subtiline dans un véhicule-retard était possible et était susceptible de présenter un intérêt quelconque. Parmi les véhicules-retards utilisés actuellement en thérapeutique, nous avons choisi le Subtosan-retard. Celui-ci est une solution à 25 % de polyvinyl-pyrrolidone, composé de masse moléculaire de l'ordre de 25.000 à 30.000, et se présente sous forme d'une solution visqueuse ; cette dernière, lorsqu'elle est utilisée comme solvant de diverses substances, possède la propriété d'augmenter la durée de leur passage dans le sang à la suite d'injections, et par suite de prolonger leur action thérapeutique. Cet effet-retard est dû à une action très complexe et peut provenir de 3 processus principaux suivant les divers médicaments auxquels il s'adresse : l'absorption locale peut être diminuée, il peut y avoir blocage de l'excrétion rénale médicamenteuse ; dans certains cas aussi (insuline), il semble intervenir une action anti-fermentaire d'ordre tissulaire.

Le Subtosan a été utilisé comme véhicule-retard dans de nombreux cas (PELLERAT et col. 95). C'est ainsi qu'on a pu l'utiliser heureusement pour l'injection d'insuline, de l'hormone cortico-surrénale, de l'extrait post-hypophysaire. Associée à la novocaïne, il prolonge l'action anesthésique. Avec le salicylate de soude, il renforce et augmente la durée de la salicylémie.

M. C. COSAR (19) a obtenu des résultats satisfaisants au laboratoire en injectant de la Pénicilline dissoute en Subtosan à des souris infectées par du Staphylocoque ou du Pneumocoque. Ces essais, appliqués en clinique humaine par d'autres auteurs (28-45-46-80), ont montré la valeur de l'association Pénicilline-Subtosan.

Nous avons tout d'abord essayé de comparer le taux d'élimination de la Subtiline injectée en eau distillée et en Subtosan. En second lieu, nous avons apprécié comparativement l'activité de diverses doses de Subtiline injectées soit en eau distillée, soit en Subtosan.

1° ELIMINATION DE LA SUBTILINE INJECTÉE SOIT EN EAU DISTILLÉE, SOIT EN SUBTOSAN.

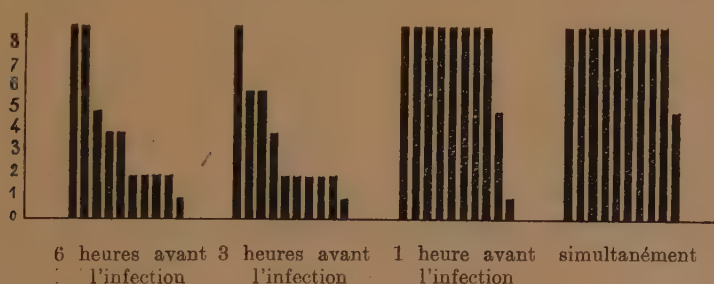
On a injecté uniformément par voie sous-cutanée, à des lots de 10 souris, 100 unités de Subtiline pour 20 grammes de souris, soit en eau distillée, soit en Subtosan, 6 heures, 3 heures, 1 heure avant l'infection. On a injecté également les mêmes doses au moment où l'on infectait les animaux avec du Streptocoque hémolytique.

L'infection a été réalisée ainsi qu'il a été déjà dit page 98, chaque souris a reçu par voie intra-péritonéale 0,5 cm³ d'une dilution 10⁻⁵ d'une culture sur bouillon ascite de la souche de Streptocoque hémolytique Dig 7.

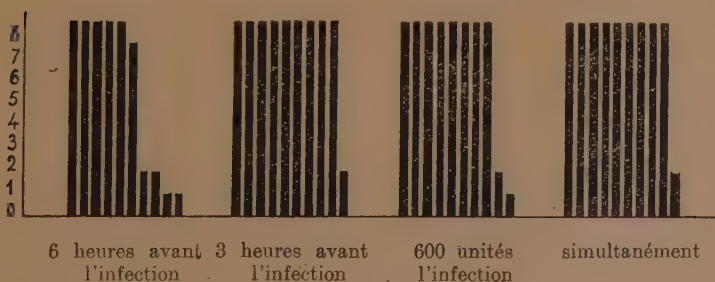
Le tableau des survies se traduit ainsi :

Injection de 100 unités de Subtiline en eau distillée

(Doses indiquées pour 20 gr. de souris. Chaque colonne représente une souris. La survie est donnée en jours par la hauteur des colonnes).



Injection de 100 unités de Subtiline en Subtosan



On voit d'après ces tableaux que l'effet de la Subtiline en Subtosoan se prolonge plus que celui de la Subtiline en eau distillée : après 3 heures, il subsiste dans l'organisme une quantité de substance active sensiblement équivalente à celle qui est apportée immédiatement après l'injection ; 6 heures après, il subsiste dans l'organisme une quantité de Subtiline bien supérieure à celle qui est conservée chez les souris ayant reçu cet antibiotique dissous en eau distillée.

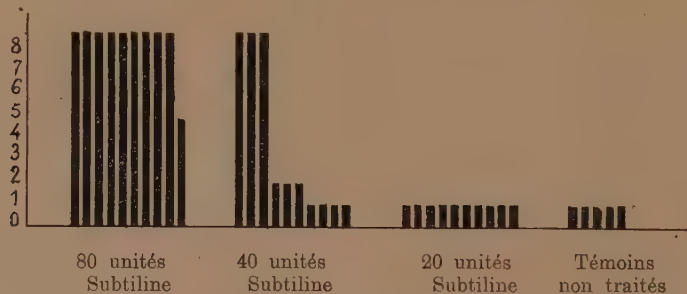
2° COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ IN-VIVO DE MÊMES DOSES DE SUBTILINE INJECTÉE EN EAU DISTILLÉE OU EN SUBTOSAN.

Des souris ont été infectées avec du *Streptocoque hémolytique* par injection intra-péritonéale de 0,5 cm³ d'une culture de 24 heures sur bouillon ascite, diluée à 10⁻⁵. Aussitôt après, elles ont reçu par voie sous-cutanée diverses doses de Subtiline parallèlement dissoutes en eau distillée ou en Subtosan. Les doses essayées sont : 80-40-20 unités pour 20 grammes de souris, chaque dose étant essayée sur 10 souris.

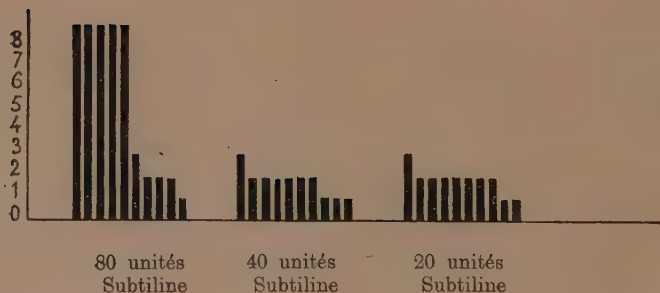
Les survies obtenues sont exprimées dans les tableaux suivants :

Injectons en eau distillée

(Doses indiquées pour 20 gr. de souris. Chaque colonne représente une souris. La survie est donnée en jours par la hauteur des colonnes).



Injections en Subtosan



Conclusion

Il semble, d'après ces 2 séries d'essais, que la Subtiline injectée en Subtosan s'élimine plus lentement que la Subtiline injectée en eau distillée. Par contre, lorsque de mêmes doses sont injectées parallèlement en eau distillée et en Subtosan, l'activité est moins marquée dans le cas du Subtosan que dans celui de l'eau distillée.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que nous avons exprimée dans le chapitre précédent, d'après laquelle l'activité *in-vivo* résulterait de l'addition des propriétés bactériostatiques et bactéricides. En effet, il est probable que le Subtosan, s'il permet la prolongation de la durée de séjour de la Subtiline dans l'organisme, ne doit pas permettre une Subtilinémie aussi élevée que celle qui suit l'injection des mêmes doses dissoutes en eau distillée ; les propriétés bactéricides se trouveraient, de ce fait, diminuées.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous nous sommes attachée, au cours de ce travail, à l'étude de divers aspects du phénomène très général de l'élaboration de substances antibiotiques par de nombreuses souches de *Bacillus subtilis*.

D'une part, nous avons constaté l'apparition de produits actifs diffusibles (exosubtilines), dans le milieu de culture d'un certain nombre de souches, et avons étudié en particulier la production de substance antistaphylococcique par la souche *B. subtilis Foster-Woodruff* et par la souche *B. subtilis ATCC 6633*.

D'autre part nous avons examiné le produit actif élaboré à l'intérieur des corps microbiens par la souche *B. subtilis ATCC 6633*.

1° Exosubtilines

1° Nous avons mis en évidence, à l'aide de la méthode des ensemencements en stries perpendiculaires, la production, par un certain nombre de souches de *B. subtilis*, de substances antibiotiques diffusant dans la gélose. Ces substances antibiotiques présentent la commune propriété d'être actives vis-à-vis du Staphylocoque.

2° Bien que les souches essayées, sans aucune exception, aient présenté des propriétés anti-staphylococciques, elles ne doivent toutefois pas toutes cette activité à la production d'une unique substance inhibitrice; en effet, lorsque l'on essaie par le même procédé leurs propriétés bactériostatiques vis-à-vis d'un certain nombre de germes, à Gram + et à Gram —, les spectres antibactériens totaux se montrent dissemblables suivant les souches de *B. subtilis*.

3° L'étude de la formation d'exosubtiline par une souche particulière, la souche *Foster-Woodruff*, a été effectuée. Un milieu peptoné glucosé additionné de certains sels minéraux s'est montré satisfaisant comme milieu de production, tout d'abord pour des cultures sur milieu gélosé, puis pour des cultures en milieu liquide réparti en boîtes de Roux.

4° Nous avons constaté que nous ne retrouvions pas, dans les filtrats sur bougie L³ de cultures en bouillon de cette souche, une

activité d'ordre comparable à celle qui est mise en évidence sur des cultures effectuées sur même milieu gélosé.

Nous avons toutefois pu mettre en évidence l'apparition d'une certaine activité anti-staphylococcique, filtrable à travers bougie L³, tout au début des cultures ; la rapidité d'apparition de cette activité et sa fugacité sont à noter.

5° Nous avons constaté qu'une activité anti-staphylococcique, filtrable à travers bougie L³, apparaissait d'une manière semblable au début des cultures, effectuées en boîtes de Roux, et dans les mêmes conditions, de la souche *B. subtilis* ATCC 6633. Il est à remarquer que cependant, par la méthode des ensemencements en stries perpendiculaires, les souches *Foster-Woodruff* et ATCC 6633 avaient sécrété des exosubtilines présentant des spectres antibactériens dissemblables.

2° Subtiline de Jansen et Hirschman

6° Nous avons étudié plus particulièrement dans cette seconde partie l'Endosubtiline formée par la souche ATCC 6633, qui est la Subtiline mise en évidence par JANSEN et HIRSCHMAN.

Tout d'abord, après un certain nombre d'essais qui nous ont permis de choisir des milieux de culture de formule convenable, nous avons effectué un grand nombre de cultures qui ont été la base de la préparation d'une certaine quantité de produit purifié que nous avons examiné dans une autre série d'essais.

Plusieurs formules de milieux de culture ont été utilisées au cours de ces cultures ; celle qui nous a semblé la plus favorable pour l'obtention d'un titre intéressant dans les cultures en surface est une formule à base de mélasse de betterave.

7° La Subtiline isolée se présente sous forme d'une poudre chamois clair, soluble jusqu'à environ 10 % dans l'eau distillée, mais les solutions ainsi obtenues précipitent par addition de ClNa ; en présence de 8,5 ‰ de ClNa, la solubilité n'est que de l'ordre de 0,2 mgr par cm³.

Nous avons pu observer la stabilité remarquable à 100° de ses solutions en eau distillée, qui présentent un pH d'environ 5, contrastant avec une instabilité d'autant plus marquée que les solutions sont plus alcalines.

L'activité de cette Subtiline n'a pas varié sous l'influence de l'action de l'acide para-amino-benzoïque ni de la Pénicillinase. Par contre, nous avons vérifié sa destruction par la pepsine, la pancréatine et la papaine. Contrairement aux données exprimées par HAS-

SAL (51), nous avons trouvé que la cystéine exerçait dans une certaine mesure un effet destructeur ou interférant à son égard.

8° Trois méthodes ont été appliquées au dosage de la Subtiline :

a) *Technique turbidimétrique*, mise au point par LEWIS et col.

a) *Méthode par dilution*, basée sur la bactériostase du *B. bulgaricus* BBY qui en se développant coagule le lait. Cette méthode est une application de la technique utilisée par SANCHEZ pour le dosage de la Pénicilline et de la Streptomycine.

c) *Méthode par diffusion*, basée sur l'inhibition de la croissance du *Micrococcus citreus* ATCC 8411. Cette dernière technique donne des résultats très satisfaisants, mais seulement pour des produits arrivés à un certain stade de purification, et non pour les premières extractions des bouillons de culture.

9° Nous avons étudié comparativement les pouvoirs bactériostatiques développés *in-vitro* sur un certain nombre de germes par la Subtiline et la Pénicilline G (sel de sodium) : celles-ci montrent deux spectres antibactériens voisins, mais comportant toutefois d'assez sensibles différences.

Par l'« agar-strek-method », nous avons pu constater, en prenant comme termes de référence les activités respectives de ces deux antibiotiques sur la souche de *Staphylocoque* 133 (de l'Institut Pasteur), une activité supérieure de la part de la Subtiline sur : *Entérocoque*, *Streptococcus fecalis*, *B. mesentericus ruber*, *Micrococcus citreus* et *Lactobacillus casei*. Sur *Sarcine* blanche, *B. mycoïdes citreus* et *B. mycoïdes albus*, l'ordre de grandeur de l'activité des deux antibiotiques est sensiblement égal. Par contre, la Subtiline ne s'est pas du tout montrée bactériostatique sur une souche de *Tétragène* ni sur une souche de *Neisseria Catarrhalis* sensibles par ailleurs à la Pénicilline.

Par la méthode des dilutions, nous avons observé un pouvoir bactériostatique du même ordre de grandeur de la part de la Pénicilline et de la Subtiline sur deux souches anaérobies : *Clostridium perfringens* et *Clostridium butylicum*.

Nous avons, d'autre part, mis en évidence l'effet bactériostatique de la Subtiline sur *Lactobacillus bulgaricus* et aussi, quoiqu'à un bien moindre degré, sur le *bacille tuberculeux*, souche d'Arloing et Courmont.

Nous soulignons que toutes les comparaisons quantitatives entre la Subtiline et la Pénicilline ne sont que d'un ordre relatif et ne mettent en œuvre que des unités et non des poids de chacun de ces produits. Il est en effet plus rationnel de baser la comparaison sur une activité antimicrobienne définie que sur des poids ; si, en effet, la Pénicilline G est un produit chimiquement défini, dont l'unité

correspond à 0,6 γ , les échantillons de Subtiline obtenus jusqu'ici ne correspondent pas à des produits purs, la fraction active étant accompagnée d'une quantité variable et inconnue de produit inactif. Le lot de Subtiline qui nous a servi au cours de ce travail titrait 140 unités par milligramme.

10° Nous avons comparé les courbes d'évolution photométrique du Staphylocoque lorsqu'il était soumis dans les mêmes conditions à diverses quantités de Subtiline et de Pénicilline G. Nous avons ainsi pu constater que des quantités croissantes de Subtiline provoquaient un retard dans la croissance du Staphylocoque, mais que néanmoins ce dernier, contrairement à ce qui se passe dans le cas de la Pénicilline, se développait après un délai plus ou moins long suivant le même rythme que la culture témoin non additionnée d'antibiotique.

11° Nous avons étudié également les propriétés bactéricides développées *in-vitro* par les deux antibiotiques et pu constater en effet bactéricide très notable de la Subtiline vis-à-vis du *Staphylocoque*, du *Pneumocoque*, du *Streptocoque hémolytique*, et du *Streptocoque viridans*.

12° Nous avons étudié l'action de la Subtiline sur des souches de Staphylocoque présentant des propriétés pénicillino-résistantes soit naturellement, soit d'une manière acquise. Inversement, le pouvoir bactériostatique de la Pénicilline a été essayé sur des souches subtilino-résistantes.

Nous avons ainsi pu constater que la résistance à l'un des deux antibiotiques n'entraînait pas une résistance vis-à-vis de l'autre.

13° L'effet du sérum a été étudié sur la Subtiline et la Pénicilline G. Il semble que nos essais puissent nous permettre de conclure à un effet partiellement et à un même degré inhibiteur de l'action bactériostatique de l'une et de l'autre.

14° Nous avons enfin étudié le pouvoir antimicrobien développé *in-vivo* par la Subtiline, et fait en sorte de le comparer quantitativement à celui que montre parallèlement la Pénicilline G. Ces essais ont été effectués en administrant à des souris les doses d'antibiotiques en une seule fois, simultanément à l'infection. Il nous ont permis de conclure à une activité sur *Staphylocoque* (souche 133), *Pneumocoque* (souche Til), *Streptocoque hémolytique* (souche Dig 7). Cette activité, en se référant aux pouvoirs bactériostatiques *in-vitro* correspondants, est plus grande de la part de la Subtiline que de la Pénicilline; peut-être ce fait peut-il être dû à l'addition des propriétés bactériostatiques et bactéricides de la première. De toutes façons, il nous laisse espérer qu'une activité

in-vivo importante puisse être manifestée par la Subtiline envers le *Streptocoque viridans*, germe sur lequel celle-ci agit sensiblement au même degré *in-vitro* que la Pénicilline.

15° Nous avons finalement constaté que la Subtiline, administrée à des souris en solution en eau distillée, s'éliminait assez rapidement de leur organisme. Cette élimination est retardée lorsqu'on l'administre en Subtosan. Toutefois, dans ce dernier cas, les taux d'activité déterminés par une seule injection sont inférieurs à ceux qui suivent une injection équivalente en eau distillée.

L'ensemble de nos essais nous permet de conclure que la Subtiline, qui en outre est d'une toxicité remarquablement basse, est un produit de valeur thérapeutique indiscutable. Son utilisation en clinique pourrait rendre de grands services, en particulier pensons-nous, dans le traitement des cas de pénicillino-résistance et des affections dues au *Streptocoque viridans*. Un écueil toutefois rencontré jusqu'alors par son utilisation consiste en son insolubilité en milieu physiologique, et à l'instabilité de ses solutions aqueuses qui précipitent très facilement sous l'influence en particulier de faibles traces d'électrolytes ; son hypothétique emploi doit donc être précédé d'essais ayant pour but de la présenter sous une forme stable et utilisable en thérapeutique humaine. Les auteurs américains étudient actuellement ce sujet ; ils semblent déjà avoir obtenu des résultats intéressants par méthylation (15-77).

Ce sujet appelle donc encore des recherches à la fois chimiques, cliniques et physiologiques.

Vu : le Président de la Thèse

A. SARTORY

Paris, le 5 Mai 1949

Pour le Doyen :

L'Assesseur,
R. DELABY

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Président du Conseil de l'Université,

Jean SARRAILH

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON H. H. — New surface active antibiotics *J. Invest. Dermatology* - **8**, 25-33 (1947).
2. ANDERSON H. H. et CHIN Y.C. — Antibiotic activity of Subtilin and Streptomycin in the presence of B A L. *Science* - **106**, 643-644 (1947).
3. ANDERSON H.H., VILLELA G.G., HANSEN E.L. et REED R.K. — Some physical and biologic properties of Subtilin and other antibiotics. *Science* - **103**, 419-420 (1946).
4. ANDERSON H.H. et WONG S.C. — Antibiotics in experimental tuberculosis. *Tuberculology* - **8**, 77-82 (1946).
5. BELOZERSKY et PASKHINA. — Chemistry of gramicidin «S». *Lancet* - **247**, 716 (1944).
6. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 6^e édition, Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md.
7. BESTA B. et KUHN H. — Untersuchungen über Antagonismus zwischen Diphtheriebacillen und anderen Bakterien. *Z. Hyg. Infektionskr.* - **116**, 520-536 (1934).
8. BITTER C.R. — Bacterial antibiosis. *J. Colorado-Wyoming Acad. Sci.* - **3**, 16-17 (1941).
9. BLAGOVESTCHENSKY. N. — Sur l'antagonisme entre les bacilles du charbon et ceux du pus bleu. *Ann. Inst. Past.* - **4**, 689-715 (1890).
10. BONET-MAURY P. — La mesure des toxicités à l'aide du graphique logarithmique-probabilité. *C.R. Soc. Biol.* - **137**, 400-402 (1943).
11. BONET-MAURY P. et PÉRAULT R. — Etude, par enregistrement photographique, du mode d'action de la corylophyline et de la pénicilline. *Ann. Inst. Past.* - **72**, 135-143 (1946).
12. BOUCHARD Ch. — Influence qu'exerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du bacille pyocyanique. *C.R. Acad. Sci.* - **108**, 713-714 (1899).
13. CHARRIN et GUIGNARD L. — Action du bacille pyocyanique sur la bactérie charbonneuse. *C.R. Acad. Sci.* - **108**, 764-766 (1899).
14. CHASSIGNEUX. — Bacillus subtilis et virus rabique. *Bull. Acad. vétér. France* - **18**, 295-298 (1945).
15. CHIN Y.C. — Effect of some derivatives of Subtilin on tubercle bacilli and rabbit leukocytes in-vitro (abstract). *Fed. Amer. Soc. Expt. Biol. Proc.* - **7**, 211-212 (1948).
16. CHOW B.F. et Mc KEE C.M. — Interaction between crystalline penicillin and human plasma proteins. *Science* - **101**, 67-68 (1946).

17. CHRISTENSEN J.J. et DAVIES F.R. — Variation in *Helminthosporium sativum* induced by a toxic substance produced by *Bacillus mesentericus*. *Phytopath.* - **30**, 1.017-1.033 (1940).
18. CORDON T.C. et HANSELER C.M. — A bacterium antagonistic to *Rhizoctonia solani*. *Soil Sci.* - **47**, 207-215 (1939).
19. COSAR C. — Augmentation de l'action thérapeutique de la Pénicilline dans diverses infections expérimentales de la souris. *C.R. Soc. Biol.* - **139**, 388-391 (1945).
20. DAVIES B.D. — Binding of sulfonamides by plasma protein. *Science* - **95**, 78 (1942).
21. DAVIES B.D. — The binding of sulfamide drugs by plasma protein. *J. Clin. Investigation* - **22**, 753-761 (1943).
22. DIMICK K.P., ALDERTON G., LIGHTBODY H.D. et FEVOLD H.L. — A method for purification of Subtilin. *Fed. Amer. Soc. Expt. Biol. Proc.* - **6**, 247-248 (1947).
23. DIMICK K.P., ALDERTON G., LEWIS J.C., LIGHTBODY H.D. et FEVOLD H.L. — Purification and some properties of Subtilin. *Arch. of Biochem.* - **15**, 1-11 (1947).
24. DUBOS R.J. — Studies on a bactericidal agent extracted from a soil Bacillus. I Préparation of the agent. Its activity in-vitro. *J. Exp. Med.* - **70**, 1-10 (1939).
25. DUBOS R.J. — Studies on a bactericidal agent extracted from a soil Bacillus. II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. *J. Exp. Med.* - **70**, 11-17 (1939).
26. DUBOS R.J. — The effect of specific agents extracted from soil microorganisms upon bacterial infections. *Ann. Int. Med.* - **13**, 2025-2037 (1940).
27. DUBOS R.J. et HOTCHKISS R.D. — The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. *J. Exp. Med.* - **73**, 629-640 (1941).
28. DUREL, M^{lle} RATNER et SIBOULET. — La Pénicilline retardée par la polyvinylpyrrolidone. *Ann. Derm. Syph.* (1947) n° 22.
29. EAGLE H., MUSSELMAN A.D. et FLEISCHMAN R. — The action of Bacitracin and Subtilin on *Treponema Pallidum* in-vitro and in-vivo. *J. of Bact.* - **55**, 347-358 (1948).
30. EAGLE H. — A paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of Pénicillin in-vitro. *Science* - **107**, 44-45 (9-1-48).
31. EMMERICH. — Heilung des Milzbrandes. *Archiv für Hygiene*, VI (1887).
32. FEENEY R.E. et GARIBALDI J.A. — Studies on the mineral nutrition of the Subtilin-producing strain of *Bacillus subtilis*. *Arch. of Biochem.* - **17**, 447-458 (1948).
33. FEENEY R.E., GARIBALDI J.A. et HUMPHREYS E.M. — Nutritional studies on Subtilin formation by *Bacillus subtilis*. *Arch. of Biochem.* - **17**, 435-445 (1948).

34. FEENEY R.E., HUMPHREYS E.M., LIGHTBODY H.D. et GARIBALDI J.A. — Nutritional studies on the formation of Subtilin by *Bacillus subtilis* in surface cultures (abstracts). *Fed. Amer. Socs. Expt. Biol. Proc.* - **6**, 250 (1947).
35. FEENEY R.E., LIGHTBODY H.D. et GARIBALDI J.A. — Zinc as an essential element for growth and Subtilin formation by *Bacillus subtilis*. *Arch. of Biochem.* - **15**, 13-17 (1947).
36. FEVOLD H.L., DIMICK K.P. et KLOGE A.A. — Isolation of Subtilin from submerged cultures. *Arch. of Biochem.* - **18**, 27-34 (1948).
37. FLEMING A. — On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exper. Path.* - **10**, 226-236 (1929).
38. FORTINEAU L. — Note sur le traitement du charbon par la pyocyanase. *Ann. Inst. Past.* - **24**, 955-972 (1910).
39. FOSTER J.W. et WOODRUFF H.B. — Microbiological aspects of Penicillin. VI. Procedure for the cup assay for Penicillin. *J. of Bact.* - **47**, 43-58 (1944).
40. FOSTER J.W. et WOODRUFF H.B. — Improvements in the cup assay for Penicillin. *J. Biol. Chem.* - **148**, 723 (1943).
41. FOSTER J.W. et WOODRUFF H.B. — Bacillin, a new antibiotic substance from a soil isolate of *Bacillus subtilis*. *J. of Bact.* - **51**, 363-369 (1946).
42. FREDERICQ P. et GRATIA A. — Phénomènes d'antibiose et de variation microbienne dans le groupe *Coli-Aerogènes*. *C.R. Soc. Biol.* - **140**, 1057-1058 (1946).
43. DE FREUDENREICH E. — De l'antagonisme des bactéries et de l'immunité qu'il confère aux milieux de culture. *Ann. Inst. Past.* - **2**, 200 (1888).
44. GARRÉ. — Conférence à la Société de Médecine Suisse. *Correspondenzblatt für Schweizer Aerzte.* - **1** (1887).
45. GATÉ et PELLERAT. — L'association pénicilline-subtosan dans le traitement de la blennorrhagie masculine. *Ann. Derm. Syph.* - **11**, p. 706 (1946).
46. GATÉ et PELLERAT. — L'association pénicilline-subtosan dans le traitement de la syphilis récente. *Ann. Derm. Syph.* - **11**, p. 707 (1946).
47. GAUSE G.F. — Colistatin : a new antibiotic substance with chemotherapeutic activity. *Science.* - **104**, 289-290 (1946).
48. GRATIA A. et DATH S. — Propriétés bactériolytiques de certaines moisissures. *C. R. Soc. Biol.* - **91**, 1442 (1924).
49. GRATIA et DATH S. — Moisissures et microbes bactériophages. *C. R. Soc. Biol.* - **92**, 461 (1925).
50. GRATIA A. et THIBAUT J. — Les agents antibiotiques des microbes du genre *Bacillus*. *Bull. Soc. Ch. Biol.* - **29**, 356-357 (1947).
51. HASSAL C.H. — Subtilin C, an antibiotic concentrate from *Bacillus subtilis*. *Nature.* - **161**, 317-318 (1948).
52. HETTICHE H.O. et WEBER B. — Die Ursache der bakteriziden Wirkung von *Mesentericus filtraten*. *Arch. f. Hyg.* - **123**, 69-80 (1939).

53. HIRSCHHORN H.N., BUCCA M.A. et THAYER J.D. — Subtenolin. An antibiotic from *Bacillus subtilis*. I. Bacteriologic properties. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **67**, 432-435 (1948).
54. HOGERHEIDE J.C. — Antibiotic substances produced by soil bacteria. *Botan. Rev.* - **10**, 599-638 (1944).
55. HOTCHKISS R.D. — Gramicidin, Tyrocidin and Tyrothricin. *Advances in enzymology.* - **4**, 153-199. - New-York, Interscience (1944).
56. HOUSEWRIGHT R.D., HENRY R.J. et BERKMAN S. — A microbiological method for the assay of Subtilin. *J. of. Bact.* - **55**, 545-550 (1948).
57. HOWEL S.F. et TAUBER H. — Subtenolin. An antibiotic from *Bacillus subtilis*. II. Isolation and chemical properties. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **67**, 432-435 (1948).
58. HUMFELD H. et FEUSTEL I.C. — Utilization of asparagus juice in microbiological culture media. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **54**, 232-235 (1943).
59. JANSEN E.F. et HIRSCHMAN D.J. — Subtilin. An antibacterial product of *Bacillus subtilis*. Culturing conditions and properties. *Arch. of Biochem.* - **4**, 297-309 (1944).
60. JOHNSON B.A., ANKER H. et MELENEY F.L. — Bacitracin : a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science.* - **102**, 376-377 (1945).
61. JOHNSON E.A. et BURDON K.L. — Eumycin. A new antibiotic active against pathogenic fungi and higher bacteria, including bacilli of tuberculis and diphtheria. *J. of. Bact.* - **51**, 591 (1946).
62. KATZNELSON H. — Inhibition of microorganisms by a toxic substance produced by an aerobic spore-forming bacillus. *Can. J. Research.* - **20**, 169-173 (1942).
63. KIMMELSTIEL P. — Ueber einige biologische Eigenschaft eines Wurzelbazillus. *Centralbl. f. Bakteriol. I, Or.* - **33**, 113-115 (1923).
64. KIMMELSTIEL P. — Weitere Versuche über die bakteriolytische Fähigkeiten des *Bacillus mycoides*. *Med. Klinik.* - **20**, 419-421 (1924).
65. LANDY M., WARREN G.-H., ROSENMAN S.B. et COLIO L.-G. — Bacillo-mycin : an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* - **67**, 539-541 (1948).
66. LEVADITI C. et HENRY J. — La Subtiline. Mécanisme de son activité antibiotique. *Presse médicale.* - 10-7-48. 493-494.
67. LEVADITI C. et TWORT C. — Sur la trypanotoxine du *B. subtilis*. Propriétés de la toxine. *C. R. Soc. Biol.* - **70**, 645-647 (1911).
68. LEVADITI C. et TWORT C. — Sur la trypanotoxine du *B. subtilis*. Mode d'action dans l'organisme. *C. R. Soc. Biol.* - **70**, 753-755 (1911).
69. LEVADITI C. et TWORT C. — Sur la trypanotoxine du *B. subtilis*. La toxo-résistance. *C. R. Soc. Biol.* - **70**, 799-801 (1911).
70. LEVADITI C. et TWORT C. — Mécanisme de la toxo-résistance à la trypanotoxine du *Subtilis*. *C. R. Soc. Biol.* - **70**, 927-929 (1911).
71. LEVADITI C. et TWORT C. — Spécificité des variétés de trypanosomes toxo-résistantes. *C. R. Soc. Biol.* - **70**, 962-964 (1911).

72. LEVADITI C. et TWORT C. — Mécanisme de la création des variétés de trypanosomes toxo-résistantes. *C. R. Soc. Biol.* - **70**, 1024-1025 (1911).
73. LEVADITI C. et TWORT C. — Considérations biologiques sur la toxo-résistance des trypanosomes. - **71**, 127 (1911).
74. LEWIS J.C., DIMICK K.P. et FEUSTEL I.C. — Production of Tyrothricin in culture of *Bacillus brevis*. *Ind. Eng. Chem.* - **37**, 996-1004 (1945).
75. LEWIS J.C., FEENEY R.E., GARIBALDI J.A., MICHENER H.D., HIRSCHMAN D.J., TRAUFLER D.H., LANGLYKKE A.F., LIGHTBODY H.D., STUBBS J.J. et HUMFELD H.H. — Subtilin production in surface cultures. *Arch. of Biochem.* - **14**, 415-425 (1947).
76. LEWIS J.C., HUMPHREYS E.M., THOMPSON P.A., DIMICK K.P., BENEDICT R.G., LANGLYKKE A.F. et LIGHTBODY H.D. — The microbiological assay of Subtilin. *Arch. of Biochem.* - **14**, 437-450 (1947).
77. LEWIS J.C. et JANSEN E.F. — Enhancement of Subtilin activity by methylation (abstract). *Fed. Amer. Socs. Expt. Biol. Proc.* - **3**, 270 (1947).
78. LINEIWEAVER H., KLOSE A.A. et ALDERTON G. — An alternate step for the isolation of Subtilin. *Arch. of Biochem.* - **16**, 311-313 (1948).
79. MC MAHAN J.R. — An improved short time turbidimetric assay for Penicillin. *J. Biol. Chem.* - **153**, 249-258 (1944).
80. MARAL R. — Contribution à l'étude du dosage de la Pénicilline dans le sang et des substances-retard en pénicillinothérapie. *Thèse Doc. Méd. Lyon.* - (1947).
81. METCHNIKOF. — Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines. *Ann. Inst. Past.* - **11**, 801-803 (1897).
82. MICHENER H.D. et SNELL N. — Antifungal activity of *Bacillus subtilis* cultures - presented before the Am. Ass. for the Advancement of Sciences, Botanical Society of American at San Diego, Calif. - Juin 1947.
83. MUCH H. — Ueber den Bac. cytoliticus. *Munchen med. Wohnschr.* - **72**, 374 (1925).
84. MUCH H. et SARTORIUS F. — Ueber die neuartige Lysine des Mycoïdes « Much ». *Med. Klin.* - **20**, 345-348 (1924).
85. NICOLLE M. — Action du « Bacille subtilis » sur diverses bactéries. *Ann. Inst. Past.* - **21**, 613-621 (1907).
86. OLIVIER H.R. — Propriétés biologiques du bacille Subtil. *Journ. des Praticiens.* - **24**, 187 (1945).
87. OLIVIER H.R. — Sur la purification de l'endosubtilysine. *C. R. Soc. Biol.* - **140**, 271-272 (1946).
88. OLIVIER H.R. et DE SAINT-RAT L. — Action du bacille Subtil dans l'infection de la souris par le « B. typhi murium ». *Presse Médicale.* - 8-12-45, p. 670.
89. OLIVIER H.R., DE SAINT-RAT L., BONET-MAURY P. et BLANCHON E. — Etude de l'action biologique du *Bacillus subtilis*. *Bull. Acad. Méd.* - **129**, 358-360 (1945).

90. OLIVIER H.R., DE SAINT-RAT L., BONÉT-MAHRY P. et BLANCHON E. — Pouvoir lytique du *Bacillus subtilis* sur le *Colibacille*, les bacilles typhiques et paratyphiques. *C. R. Soc. Biol.* - **139**, 464 (1945).
91. OLIVIER H.R., DE SAINT-RAT L. et CORVASIER P. — Etude de l'activité d'un extrait de corps microbiens de *Bacille Subtil* sur le *Staphylocoque*. *C. R. Soc. Biol.* - **139**, 998-1000 (1945).
92. PALAZZOLI M. et NITTI F. — Traitement de la blennorragie par le Sulfamide, une Sulfone, et leurs dérivés. *Masson.* - 1939, p. 116.
93. PASTEUR. — Expériences tendant à démontrer que les poules vaccinées pour le chloréra sont réfractaires au charbon. *C. R. Acad. Sc.* - **91**, 315 (1880).
94. PAWLOWSKY. — Heilung des Milzbrandes durch Bacterien. *Virchow's Archiv.* - CVIII, 494 (1887).
95. PELLERAT, MARAL R. et Mlle MURAT. — Les applications du subto-san-retard. *Journ. méd. Lyon.* - 5-9-47, p. 641-658.
96. PRINGSHEIM K.G. — Ueber die gegenseitige Schädigung und Forderung von Bakterien. *Centralbl. f. Bakteriöl. II.* - **51**, 72-85 (1920).
97. RAMON G. et RICHOU R. — Des propriétés antagonistes des filtrats de culture du « *B. subtilis* » à l'égard de certaines bactéries et des toxines microbiennes. *Presse Médicale.* - 28-7-45, 405-406.
98. RAMON G. et RICHOU R. — Les filtrats de culture du *B. subtilis* ou de germes analogues et leurs propriétés altérantes et destructrices à l'égard des toxines bactériennes. *C. R. Acad. Sc.* - **220**, 802-805 (1945).
99. RAMON G. et RICHOU R. — De l'influence de la chaleur sur les propriétés antagonistes des filtrats de *B. subtilis* à l'égard des bactéries pathogènes et des toxines microbiennes. *C. R. Acad. Sci.* - **221**, 213-217 (1945).
100. RAMON et RICHOU R. — De l'influence, sur les propriétés antibiotiques et antidotiques des filtrats de culture du *B. subtilis*, de la chaleur et de l'aldéhyde formique agissant simultanément. *C.R. Acad. Sci.* - **222**, 261-263 (1946).
101. RAMON G., RICHOU R. et RAMON P. — Sur les propriétés diastasiques, bactériostatiques, bactéricides et bactériolytiques des filtrats de culture du *Bacillus subtilis*. *C.R. Acad. Sci.* - **220**, 543-547 (1945).
102. REMLINGER P. et BAILLY J. — Action des filtrats de cultures de *Bacillus subtilis* sur le virus de la rage. *C.R. Acad. Sci.* - **223**, 118-120 (1946).
103. ROSENTHAL L. — Microbes bactériolytiques (Lysobactéries). *C.R. Soc. Biol.* - **92**, 78-79 (1925).
104. ROSENTHAL L. — Mécanisme de l'action des lysobactéries. *C.R. Soc. Biol.* - **92**, 472-474 (1925).
105. ROSENTHAL L. — Sur des lysobactéries thermophiles. *C.R. Soc. Biol.* - **93**, 1569-1571 (1925).
106. ROSENTHAL L. — Action of sporogenic aerobic bacilli on living and dead bacteria. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **46**, 448-449 (1941).
107. ROSENTHAL L. et DURAND-REYNALDS F. — *Tyrothrix scaber* et flore intestinale. *C.R. Soc. Biol.* - **94**, 309-310 (1926).

108. ROSENTHAL L. et ILITCH Z. — Sur le pouvoir lytique des filtrats de *Tyrophrix scaber* - **95**, 10 (1926).
109. SALLE A.J. et JANN G.J. — Subtilin. An antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. I. Action on various organisms. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **60**, 60-64 (1945).
110. SALLE A.J. et JANN G.J. — Subtilin. An antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. II. Toxicity of Subtilin to living embryonic tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **61**, 23-24 (1946).
111. SALLE A.J. et JANN G.J. — Subtilin. An antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. III. Effect on type III *Pneumococcus* in mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **62**, 40-42 (1946).
112. SALLE A.J. et JANN G.J. — Subtilin. An antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. IV. Effect of Subtilin on the course of experimental anthrax infections in guinea pigs. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **63**, 41-42 (1946).
113. SALLE A.J. et JANN G.J. — Subtilin. An antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. V. Effect on *Streptococcus pyogenes* in mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* - **63**, 519-520 (1946).
114. SALLE A.J. et JANN G.J. — The effect of Subtilin in the treatment of experimental infections in animals. *J. of Bact.* - **51**, 592 (1946).
115. SALLE A.J. et JANN G.J. — Studies on Subtilin fatness in-vitro. *J. of Bact.* - **65**, 463-469 (1948).
116. SANCHEZ G. et LAMENSANS A. — Méthode de dosage rapide de la Pénicilline et de la Streptomycine. *C.R. Acad. Sci.* - **224**, 1189-1191 (1947).
117. SANCHEZ G. et LAMENSANS A. — Dosage simple et rapide de la Pénicilline et de la Streptomycine dans les solutions, les émulsions, les pommades. *Ann. Inst. Past.* - **74**, 142-146 (1948).
118. SCHMIDT W.H. et MOYER A.J. — Penicillin. I. Methods of assay. *J. of Bact.* - **47**, 199-208 (1944).
119. SHAFFER P.A. et SOMOGYI M. — Copper-iodometric reagents for sugar determination. *J. Biol. Chem.* - **100**, 695-713 (1933).
120. SOMOGYI M. — Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* - **70**, 599-612 (1926).
121. STANSKY P.G. et ANANENKO N.H. — Resistance of Polymixin to some proteolytic enzymes. *Arch. of Biochem.* - **15**, 473-474 (1947).
122. STUBBS J.J., FEENEY R.E., LEWIS J.C., FEUSTEL I.C., LIGHTBODY H.D. et GARIBALDI J.A. — Subtilin production in submerged culture. *Arch. of Biochem.* - **14**, 427-435 (1947).
123. TOMPSETT R., SHULTZ S. et Mc DERMOTT W. — The relation of protein binding to the pharmacology and antibacterial activity of Penicillins X, G, dihydro F, and K. *J. of Bact.* - **53**, 581-595 (1947).
124. VALLÉE M. — Etude du pouvoir bactériolytique de *Bacillus subtilis*. *C.R. Soc. Biol.* - **139**, 148-149 (1945).
125. VALLÉE M. — Etude du pouvoir bactériolytique du *Bacillus subtilis*. Lysine et alanine. *C.R. Soc. Biol.* - **139**, 648-649 (1945).
126. VAN CANNEYT J. — Action du *Bacillus subtilis* et de ses sécrétions sur le bacille de la tuberculose. *C.R. Soc. Biol.* - **95**, 878-881 (1926).

127. VAUDREMER A. — Action de l'extrait filtré d'*Aspergillus fumigatus* sur les bacilles tuberculeux. *C.R. Soc. Biol.* - **74**, 278-280 ; 752-754 (1913).
128. WAKSMAN S.A. et REILLY H.C. — Agar-streak method for assaying antibiotic substances. *Ind. and Eng. Chem. (Analytic Ed.)* - **17**, 555-558 (1945).
129. WATSON-CHEYNE. — London Medical Record (1887).
130. WEILAND P. — Bakterizide Wirkung von Mesentericus filtraten auf diphtheriebazillen. *Zentralbl. f. Bakteriol., I, Or.* - **136**, 451-456 (1936); **147**, 321-334 (1941).
131. WILSON R.H., LEWIS J.C. et HUMPHREYS E.M. — Subtilin in blood after parenteral administration (abstract). *Fed. Amer. Soc. Exptl. Biol. Proc.* - **7**, 266 (1948).
132. WOLF J.E. — Beiträge zur Biologie des Pfeifferschen Influenza bazillus Mischkulturen. Mischinfektion. *Centralbl. f. Bakteriol. I, Or.* - **84**, 241-255 (1920).
133. WONG S.C., HAMBLY A.S. et ANDERSON H.H. — Use of modified Dubos and Davis medium for demonstration of antibiotic activity of Subtilin against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Lab. Clin. Med.* - **32**, 837-841 (1947).
134. WRRL. Anonyme. — Subtilin from asparagus waste. *Chem and Engin. News.* - **25**, 1070-1078 (1947).
135. WRRL. Anonyme. — Subtilin output and purification. *Oil, Paint and Drug Reporter* - **151**, 54-55 (1947).
136. WRRL. Anonyme. — « Process for production of asparagus juice concentrate », mimeographed circular AIC-70, Western Regional Research Laboratory, Albany, Calif.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	9
<i>Historique</i>	13
Introduction. Antagonisme microbien.....	13
Substances antibiotiques produites par les bacilles du groupe <i>B.subtilis</i>	14
<i>Définition du Bacillus subtilis</i>	19

1^{re} PARTIE : EXOSUBTILINES.

I. — <i>Etudes préliminaires : mise en évidence d'exosubtilines par la méthode des ensemencements en stries perpendiculaires</i>	21
1° Mise en évidence de la production, par diverses souches de <i>B.subtilis</i> , de produits antimicrobiens diffusant dans la gélose	23
2° Etude des spectres antibactériens présentés par les exosub- tilines de cinq souches de <i>B.subtilis</i>	23
3° Etude d'un milieu favorisant la production d'exosubtiline active sur <i>Staphylocoque</i> par la souche Foster-Woodruff....	25
II. — <i>Etude du pouvoir antibiotique des filtrats de culture des souches B.subtilis Foster-Woodruff et ATCC 6633</i>	27
Techniques d'essai	28
Conditions de culture. — Prélèvements. — Mesure du pH. Dosage des substances réductrices. — Dosage de l'exosubtiline filtrable.	
1° Essais conduits avec la souche Foster-Woodruff. — Etude des milieux de production.....	30
I. — Conditions générales de culture sur un milieu-type.	30

II. — Etude de quelques modifications du milieu de culture	33
A) Modification du taux de glucose. — B) Emploi de divers sucres. — C) Modification de la proportion des éléments minéraux. — D) Comparaison de la valeur de divers éléments azotés. — E) Addition d'asparagine. — F) Addition d'acide glutamique et d'asparagine aux milieux de culture	
2° Production d'exosubtiline filtrable par la souche ATCC 6633.	36
Culture sur milieu-type. — Comparaison avec la souche Foster-Woodruff	36
Emploi de divers sucres dans le milieu de culture.....	37
Etude sommaire de l'activité de cette exosubtiline....	38
<i>Conclusion</i>	38

2° PARTIE : PRODUCTION D'ENDOSUBTILINE PAR LA SOUCHE B.SUBTILIS ATCC 6633.

I. — <i>Conditions de production de l'Endosubtiline</i>	43
Techniques d'essai	43
Organisme. — Préparation d'un inoculum et ensemencement des milieux de culture. — Cultures productrices d'antibiotiques. — Prélèvements et estimation de l'activité.....	
Milieux utilisés pour la production d'endosubtiline.....	45
Etude de quelques milieux de production de Subtiline.....	48
Extraction de la Subtiline.....	52
Dosage de la Subtiline.....	53
Technique turbidimétrique. — Méthode basée sur la bactériostase du <i>Lactobacillus bulgaricus</i> . — Méthode par diffusion.....	
II. — <i>Quelques propriétés de la Subtiline isolée</i>	61
Stabilité à 100° de solutions aqueuses de Subtiline.....	61
Action de l'acide Para-amino-benzoïque sur la Subtiline....	63
Action de la cystéine sur la Subtiline.....	65
Action des ferments protéolytiques sur la Subtiline.....	66
Action de la Pénicillinase sur la Subtiline.....	69

III. — <i>Etude comparative des propriétés antimicrobiennes de la Subtiline et de la Pénicilline G</i>	71
<i>Activités bactériostatiques et bactéricides in-vitro</i>	71
1° Activité bactériostatique exercée par la Subtiline et la Pénicilline G envers différents germes.....	72
2° Etude par enregistrement photométrique de l'action antibiotique exercée sur le Staphylocoque par la Subtiline et la Pénicilline G.....	76
3° Activités bactériostatiques et bactéricides comparées exercées par la Subtiline et la Pénicilline G envers : Staphylocoque, Streptocoque hémolytique, Streptocoque viridans, Pneumocoque	79
4° Activité de la Subtiline sur des souches de Staphylocoque pénicillino-résistantes	87
5° Effet du sérum sur le pouvoir bactériostatique de la Subtiline et de la Pénicilline.....	90
<i>Activité in-vivo de la Subtiline</i>	93
Toxicité	94
Comparaison du degré d'activité in-vivo de la Subtiline et de la Pénicilline G sur Pneumocoque Streptocoque hémolytique, Staphylocoque	95
a) Activité sur Pneumocoque	96
b) Activité sur Streptocoque hémolytique.....	100
c) Activité sur Staphylocoque.....	100
<i>Conclusion</i>	102
<i>Elimination de la Subtiline. — Administration en Subtosan-retard</i>	104
Elimination de la Subtiline injectée soit en eau distillée, soit en Subtosan.....	105
Comparaison de l'activité in-vivo de mêmes doses de Subtiline injectées en eau distillée ou en Subtosan....	106
<i>Conclusions générales</i>	109
<i>Bibliographie</i>	115

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté

LES FACTEURS DE CROISSANCE DES BACTERIES
LEUR UTILISATION POUR LA CULTURE
DES BACTERIES EN MILIEUX SYNTHETIQUES

Imprimerie RICHARD
24, rue Stéphenson
Paris (XVIII^e)
Tél. Mon. 88-26 et 88-27

